

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**DESULFURACIÓN DE
DIBENZOTIOFENO CON
PSEUDOMONAS PUTIDA CECT5279:
FORMAS DE OPERACIÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier Calzada Funes

Directores:

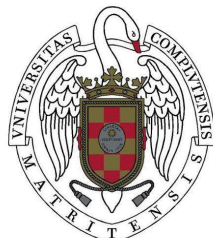
**Félix García-Ochoa Soria
Victoria E. Santos Mazorra**

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**DESULFURACIÓN DE
DIBENZOTIOFENO CON
PSEUDOMONAS PUTIDA CECT5279:
FORMAS DE OPERACIÓN**

MEMORIA

que para optar al grado de Doctor

presenta

JAVIER CALZADA FUNES

Madrid, marzo de 2010

Trabajo cofinanciado por el Fondo Social Europeo
y el Ministerio de Ciencia e Innovación.



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**DESULFURACIÓN DE
DIBENZOTIOFENO CON
PSEUDOMONAS PUTIDA CECT5279:
FORMAS DE OPERACIÓN**

MEMORIA

que para optar al grado de Doctor

presenta

JAVIER CALZADA FUNES

Madrid, marzo de 2010

El Dr. Félix García-Ochoa Soria, Catedrático de Ingeniería Química y la Dra. Victoria Eugenia Santos Mazorra, Profesora Titular de Universidad, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria, que ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Los Directores

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dra. Victoria E. Santos Mazorra

El Doctorando

Javier Calzada Funes

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral es el resultado de la contribución de muchas personas tanto dentro como fuera del laboratorio. Todas ellas han participado en este proyecto desde muchos y diferentes aspectos. No sólo desde un punto de vista científico o técnico, sino sobre todo, desde una aportación personal muy importante.

Gracias a mis directores por su dedicación e implicación a lo largo de estos cuatro años. Son muchas las reuniones, los correos con ficheros adjuntos, los congresos, las conversaciones telefónicas,...

Muchas gracias al Dr. Félix García-Ochoa por toda su ayuda a lo largo de esta Tesis. Quiero agradecerte tu paciencia, apoyo, consejos y seguimiento en este trabajo; además de la oportunidad y la confianza puesta en mí para participar en este proyecto. Desde Segovia hasta ahora se han producido muchos cambios. Han sido muchas experiencias personales que me han permitido conocer diferentes aspectos del mundo de la investigación. Gracias por participar de esas vivencias y de este aprendizaje con tu tiempo y tu esfuerzo.

Muchas gracias a la Dra. Victoria E. Santos por abrirme la puerta a este campo y por todo lo que hemos compartido desde que empezó mi trabajo en el laboratorio. Desde que surgió la posibilidad de hacer el proyecto de investigación he podido aprender y disfrutar de este mundo de "los bichos" que, a pesar de lo que esclaviza, acaba enganchándonos. Gracias por contar conmigo para continuar "luchando" con el DBT, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* y algún otro que aparezca por el camino. Quiero agradecerte la ilusión y motivación que transmites, las conversaciones, los consejos, los ánimos,...

Gracias a los dos por la "venta de moto" por la que sigo en estos líos y que me ha permitido alcanzar esta etapa en mi vida y abrir más posibilidades para el futuro.

Muchas gracias a la Dra. Almudena Alcón por su ayuda y disponibilidad, por sus ánimos y su alegría. Por cumplir un papel imprescindible en este Grupo, que se manifiesta no sólo en el saber hacer y transmitir, sino también en un apoyo enorme dentro y fuera del laboratorio. Destacas como profesional y como persona. Por tus consejos y ánimos, y por ser otro de los principales "responsables" de estar apegado a este mundillo.

Quiero agradecer al Dr. Emilio Gómez sus ánimos constantes y su buen humor. Gracias por estar ahí, por tus consejos y por tu disponibilidad para echar una mano en todo lo necesario. Lo he dicho en otras ocasiones: es un placer compartir contigo el laboratorio y todas esas conversaciones que han surgido y seguirán apareciendo. Gracias por seguir siendo un apoyo importante para todos nosotros y una referencia en el Grupo.

Muchas gracias al Dr. Pedro Yustos por toda su ayuda a lo largo de esta Tesis. Sin su trabajo y esfuerzo en la síntesis de determinados compuestos intermedios, su ayuda en cromatografía HPLC y otros aspectos, este trabajo no habría sido posible. Muchas gracias por tu apoyo, preocupación e implicación en los aspectos más técnicos y los más personales. Es un lujo contar con una persona como tú.

Quiero dar las gracias al Dr. Miguel Ladero por toda su colaboración y consejo a lo largo de este trabajo. También por tu confianza y acompañamiento en la faena anterior a esta Tesis, con la colofonia. Muchas gracias por estar pendiente de nuestros problemas con el HPLC, con las gomas de silicona, y demás líos en que te hemos metido. Gracias por todo tu esfuerzo, amabilidad y disponibilidad.

Muchas gracias a la Dra. María Isabel Guijarro. Por todo su apoyo y sus ánimos. Por la suerte de tener como "vecina" del sótano a una gran persona como tú. Por tu experiencia, consejos, aliento... Un verdadero privilegio contar contigo.

Quiero agradecer la enorme colaboración del Grupo de Investigación del Dr. José Luis García del Departamento de Microbiología Molecular del CIB. Gracias por abrir vuestras puertas para consultar dudas, enseñarnos a trabajar con la cepa, acoger nuestros glicerolos,... Muchas gracias a Merche Zazo y Teresa Zamarro por toda vuestra ayuda, consejos, ánimos,..., por hacerme un hueco en el congelador de -80°C todo este tiempo, por vuestra implicación en este proyecto junto con José Luis, Eduardo Díaz, Isa, Javi y demás compañeros que trabajan en los laboratorios. Es un gustazo poder trabajar con personas como vosotros.

Gracias también por su colaboración al Grupo de Gestión Integral del Agua y Procesos Biotecnológico del Dr. Eloy García y Pedro Letón de la Universidad de Alcalá de Henares, con quienes hemos compartido el proyecto de biodesulfuración. Especialmente a Karina Boltos y Raúl Alonso, por toda su ayuda y consejos, sobre todo, en lo que se refiere a los métodos de análisis.

Muchas Gracias a Inmaculada Erdocia y José Timón por todo vuestro apoyo, ayuda, ánimos, conversaciones, consejos. Es un placer contar con vosotros y disfrutar de vuestra forma de ser. Sin todo lo que os hace únicos como persona, todos estos jaleos de la mudanza (¡y menuda mudanza!), los fermentadores, los autoclaves, las balas, las prácticas,..., serían cuesta arriba. Qué lujo poder contar con vosotros.

Ana, Kris y yo formamos el grupo de los "Tres Mosqueteros" que empezamos la Tesis a la vez en el "Laboratorio de Arriba". Es imposible olvidar las comidas, las horas en el laboratorio, los cafés, las terapias de grupo, los fuegos "artificiales",... Bueno, a lo mejor éstos últimos se pueden olvidar... Es una suerte tremenda haber podido compartir todos estos momentos y poder conoceros. Aunque en esta última etapa no nos vemos a diario por los líos de cada uno, es y seguirá siendo un verdadero placer contar con vosotras, veros

asomar al balcón o quedar a tomar un café. Muchas gracias por ser como sois. No cambiéis.

Hemos trabajado varios años con Espe en el "Laboratorio de Al Lado". Y ahora, aunque estamos en edificios diferentes, seguimos en la misma faena. Muchas gracias por toda tu ayuda con los "bichos" y con lo que no son bichos. Por contar contigo para tantas cosas.

Sin vosotras, vuestra ayuda, nuestras conversaciones, las risas y vuestro apoyo, esta Tesis no habría llegado a su fin.

El número de "Locos" en el laboratorio aumentó con Sonia, Jaime y Guille. Entre las perlas de *Rhodococcus*, las "contaminaciones cruzadas", las amenazas de *Klebsiella* y el hexadecano, fue un lujo disfrutar de vuestra ayuda y vuestra forma de ser, que estuvo a la altura en los momentos difíciles, como la mencionada mudanza. Muchas gracias por todo lo que compartimos juntos.

La "Familia" siguió creciendo con Vane, Laura e Igor, Javi, Sebastián y Gonzalo. Es una suerte vivir con vosotros tantas cosas dentro y fuera del laboratorio. Muchas Gracias por toda vuestra ayuda, por cómo sois, por continuar las "tomas falsas" en el "locutorio", por los "pintxos", las luchas con el autoclave,...

Muchas gracias a los compañeros del Laboratorio de la Planta Baja: Laura, Juanjo y Souto. En los congresos, en las cenas, en los líos de nuestras Tesis,.... Gracias por todo lo que aportáis, por las conversaciones y un montón de buenos momentos.

No me puedo olvidar de Sergio y Fernando, que merecen una mención especial. Han estado al pie del cañón en todo momento. Muchas gracias por todo lo que hemos compartido, por vuestro apoyo, nuestras conversaciones, los consejos,.... Es una suerte poder contar con vosotros desde hace tanto tiempo. Muchas gracias, Pili y Goyo, por todo lo que tenemos en común desde que

empezamos en esta casa, por vuestro ánimo y cariño. Gracias por estar aquí; sois únicos e irrepetibles.

Gracias a mi Familia por su apoyo en todo momento. Por vuestro interés, por vuestros ánimos y por toda vuestra ayuda. Gracias a mis Padres, que han estado en los mejores y los peores momentos; que han ayudado en la distancia y en la cercanía (desde Segovia a Gotemburgo). Muchas gracias por el Regalo de la Vida y participar de muchas de las vivencias que nos trae. Por la gran admiración que siento hacia vosotros y por el ejemplo de entrega que dais.

Muchas gracias a Todos los Amigos. Habéis vivido esta Tesis conmigo, y muchas de las cosas que lleva a su alrededor. Por vuestra cercanía, aliento, consejos, por vuestra alegría, acompañamiento,..., por estar ahí. Marta, Carlos, Miguel, Marisa, Raquel,... como siempre: Gracias por contar con vosotros, contad conmigo.

A Todos un Abrazo Muy Fuerte,

Javi

Deseo agradecer el apoyo económico a este trabajo por parte del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación a través de la financiación de los proyectos de investigación CTQ2004-06553-C02-01 y CTQ2007-60919/PPQ, acompañados del Programa de Ayudas para la Formación de Personal Investigador (Programa FPI), cofinanciado por el Fondo Social Europeo. Asimismo, quiero dar las gracias al Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación UCM-BSCH por la financiación concedida al Grupo de Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales (nº 910134). Sin estas financiaciones no habría sido posible realizar esta Tesis doctoral.

**A mis Padres,
me dieron la Vida,
me dan la Vida.**

“(…)

Qu'il neige sur ma vie, gèle en mon cœur,
Tombent les pluies rien ne me fait peur.

Loin d'ici, loin des douleurs,

je sais où ressusciter.

Je sais où aller.

Ce sont des visages familiers,

Des vieux que l'âge incruste peu à peu.

Dans nos paysages montagneux

Des hommes comme des rochers.

C'est une enfance que je chéris.

C'est une chance de pousser ici.

Prison de soleil au milieu des mers,

Terre de rêve et repère.

Qu'il neige sur ma vie, gèle en mon cœur,

Tombent les pluies rien ne me fait peur.

Loin d'ici, loin des douleurs,

je sais où ressusciter.

Je sais où aller.

(…)”

Jean Jacques Goldman

“Je sais où aller”, 2002

“(…)

Cambia, todo cambia.

Cambia, todo cambia.

Cambia el sol en su carrera,

cuando la noche subsiste.

Cambia la planta y se viste,

de verde en la primavera.

Cambia el pelaje la fiera,

cambia el cabello el anciano.

Y así como todo cambia

que yo cambie no es extraño.

Pero no cambia mi amor

por más lejos que me encuentre,

ni el recuerdo ni el dolor

de mi tierra y de mi gente.

Y lo que cambió ayer

tendrá que cambiar mañana.

Así como cambio yo

en esta tierra lejana.

Cambia, todo cambia.

Cambia, todo cambia.

(…)”

Julio Numhauser

“Todo cambia”, 1982

ÍNDICE

1	Introducción	- 1 -
1.1	El problema del azufre en los combustibles fósiles	- 5 -
1.1.1	Causas naturales y antropogénicas de la emisión de óxidos de azufre	- 5 -
1.1.2	Efectos de los óxidos de azufre	- 10 -
1.1.3	Legislación	- 15 -
1.2	Soluciones tecnológicas para la eliminación del azufre	- 17 -
1.2.1	Limitaciones de la Hidrodesulfuración	- 19 -
1.3	Biodesulfuración.....	- 20 -
1.3.1	Estado del arte de la BDS	- 22 -
1.3.1.1	Biocatalizadores para la BDS	- 29 -
1.3.1.2	Desarrollo de un proceso de BDS.....	- 34 -
1.4	<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279.....	- 39 -
1.5	Objeto y alcance del trabajo	- 41 -
2	Materiales y métodos	- 47 -
2.1	Materiales	- 47 -
2.1.1	El microorganismo.....	- 47 -
2.1.2	Reactivos	- 49 -
2.1.2.1	Síntesis de reactivos no comerciales.....	- 52 -
2.1.3	Composición de los medios empleados.....	- 54 -
2.1.4	Equipos	- 56 -
2.2	Protocolos experimentales	- 66 -
2.2.1	Métodos de análisis.....	- 66 -
2.2.1.1	Seguimiento de la biomasa	- 66 -
2.2.1.2	Medida de la cantidad de proteína celular total.....	- 67 -
2.2.1.3	Determinación de la concentración de la proteína DszB	- 68 -
2.2.1.4	Seguimiento de los compuestos de la ruta 4S	- 70 -
2.2.2	Procedimientos experimentales	- 75 -
2.2.2.1	Obtención del biocatalizador	- 75 -
2.2.2.2	Experimentos de desulfuración en resting cells.....	- 78 -

2.2.2.3	Medida de actividad enzimática	- 79 -
2.3	Métodos matemáticos	- 79 -
2.3.1	Métodos de cálculo	- 80 -
2.3.2	Métodos de ajuste	- 82 -
2.3.3	Programas empleados.....	- 83 -
3	Estudio preliminar	- 87 -
3.1	Criterios para la evaluación de las formas de operación	- 88 -
3.2	Biodesulfuración durante el crecimiento.....	- 90 -
3.2.1	Resultados experimentales	- 90 -
3.2.2	Interpretación de los resultados	- 94 -
3.2.2.1	Influencia de la biodesulfuración en el crecimiento del microorganismo	- 94 -
3.2.2.2	Eficiencia del sistema de operación	- 97 -
3.3	Biodesulfuración en condiciones de <i>resting cells</i>	- 100 -
3.3.1	Resultados experimentales	- 101 -
3.3.2	Interpretación de los resultados	- 103 -
4	Estudio de las actividades enzimáticas intracelulares de la Ruta 4S.....	- 111 -
4.1	Resultados experimentales	- 112 -
4.2	Determinación de la actividad enzimática intracelular.....	- 119 -
4.2.1	Primera reacción: oxidación de DBT	- 121 -
4.2.2	Segunda reacción: oxidación de DBTO.....	- 123 -
4.2.3	Tercera reacción: oxidación de DBTO ₂	- 126 -
4.2.4	Cuarta reacción: eliminación del átomo de azufre de HBPS.....	- 128 -
4.2.4.1	Cuantificación de la proteína DszB producida	- 131 -
4.3	Implicaciones derivadas de este estudio	- 135 -
5	Desarrollo de formas de operación para la desulfuración de DBT	- 143 -
5.1	Empleo de un biocatalizador simple	- 145 -
5.1.1	Resultados experimentales	- 146 -
5.1.2	Interpretación de los Resultados	- 150 -
5.2	Empleo de biocatalizadores compuestos.....	- 156 -
5.2.1	Operación secuencial	- 157 -
5.2.1.1	Resultados experimentales	- 159 -
5.2.1.2	Interpretación de los resultados experimentales	- 169 -
5.2.2	Operación simultánea	- 181 -
5.2.2.1	Resultados experimentales	- 184 -

5.2.2.2	Interpretación de los resultados experimentales	- 195 -
5.3	Comparación de las diferentes formas de operación	- 214 -
6	Modelo cinético.....	- 229 -
6.1	Formulación del modelo cinético.....	- 231 -
6.2	Resultados experimentales	- 234 -
6.3	Determinación de los parámetros cinéticos	- 243 -
6.3.1	Método de velocidades de reacción	- 245 -
6.3.1.1	Células de 5 h de tiempo de crecimiento.....	- 248 -
6.3.1.2	Células de 23 h de tiempo de crecimiento.....	- 261 -
6.3.2	Método de velocidades de producción.....	- 274 -
6.3.2.1	Células de 5 h de tiempo de crecimiento.....	- 277 -
6.3.2.2	Células de 23 h de tiempo de crecimiento.....	- 282 -
6.4	Predicción del comportamiento de mezclas de células de distinta edad	- 289 -
7	Resumen y conclusiones	- 299 -
7.1	Resumen.....	- 299 -
7.2	Conclusiones.....	- 306 -
8	Nomenclatura.....	- 321 -
9	Bibliografía	- 329 -

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El acceso a la energía es esencial para el desarrollo económico y social de los pueblos (UN-Energy, 2005) Existe una relación clara entre el consumo de energía por habitante y el grado de desarrollo económico y de bienestar de una sociedad determinada, como se observa en la Figura 1.1. Por este motivo, el gasto energético *per cápita* es uno de los indicadores empleados en la actualidad para estimar la situación de un país o una comunidad en este aspecto. Actualmente, Noruega y Australia ocupan los primeros puestos según el índice de desarrollo humano empleado por Naciones Unidas, con un PIB *per cápita* en 2007 de 53.433 y 34.923 \$/habitante y valores de consumo de energía de 24.997 y 11.216 kWh/habitante, respectivamente. Estados Unidos y España se encuentran en los puestos 13 y 15, respectivamente, siendo sus PIB *per cápita*, en el mismo año, de 45.592 y 31.560 \$/habitante y sus consumos por habitante de 13.616 y 6.296 kWh. En contraste, la República Democrática del Congo ocupa el puesto 176 según el índice de desarrollo humano, con un PIB *per cápita* en 2007 de 298 \$/habitante y un consumo de energía de 127 kWh/habitante (ONU, 2009; International Energy Agency Office, 2009).

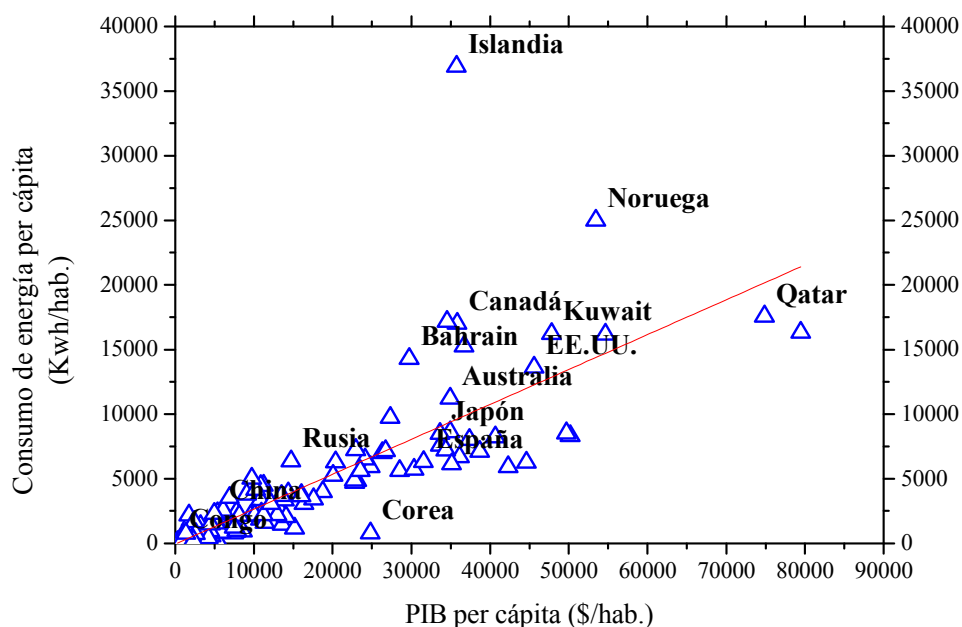


FIGURA 1.1 - Representación del consumo de energía *per cápita* frente al PIB *per cápita* para diferentes países (International Energy Agency Office, 2009).

Las necesidades energéticas de la población del planeta experimentan un claro aumento. El consumo mundial de energía ha crecido un 77 % en treinta y cinco años, a un ritmo del 2,2 % por año, como se observa en la Figura 1.2. En 2007, el consumo mundial de energía alcanzó 8286 Mtep, distribuido por regiones según se muestra en la Figura 1.3. Los países de la OCDE consumen el 45,5 % de la energía mundial (23 % correspondiente a América del Norte y 15,5 % a Europa), seguidos de China, con un 15,2 % del total, y del resto del continente asiático con un 11,5% (International Energy Agency Office, 2009).

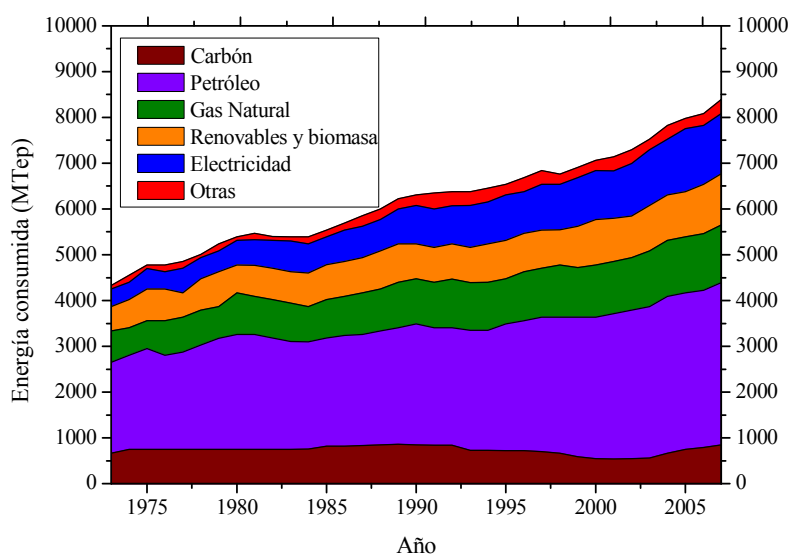


FIGURA 1.2 - Evolución del consumo de energía entre 1973 y 2007 (International Energy Agency Office, 2009).

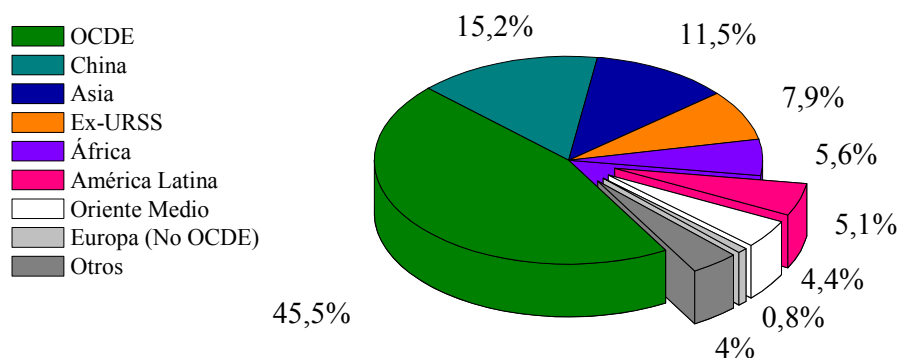


FIGURA 1.3 -Distribución del consumo de energía según áreas geoeconómicas.

La proporción de energía consumida que procede de combustibles fósiles a nivel mundial ha experimentado un ligero descenso en los últimos treinta y cinco años de un 75,7% a un 67,0%, a raíz del desarrollo de otras fuentes de energía, como la nuclear, las energías renovables y la valoración energética de los residuos. Sin embargo, en valores absolutos, el consumo de energía procedente del petróleo, el gas natural y el carbón sigue en aumento (desde 3.539 Mtep en 1973, a 5.551 Mtep en 2007) (International Energy Agency Office, 2009).

Para hacer frente a la creciente demanda mundial, la producción de energía primaria casi se ha duplicado entre 1973 y 2007, pasando de 6.115 Mtep a 12.029 Mtep. El consumo aparente de energía a partir de combustibles fósiles (esto es, la producción de energía debida a este grupo de combustibles, teniendo en cuenta las importaciones y exportaciones y cambios en las reservas) representa actualmente el 81,4 % de la energía generada. Aunque este porcentaje se ha reducido en los últimos treinta y cinco años a favor de la energía nuclear, de hecho, se ha producido un aumento en la energía generada a partir del petróleo, el carbón y el gas natural en ese período, pasando de 5.596 Mtep a partir de combustibles fósiles a 9.792 Mtep. Este hecho refleja la gran dependencia energética de los combustibles fósiles que existe en la actualidad, a pesar de los intentos por reducir su consumo, a raíz de los problemas ambientales que implica la combustión de carbón y de combustibles derivados del petróleo, como se refleja en la Figura 1.4 (International Energy Agency Office, 2009).

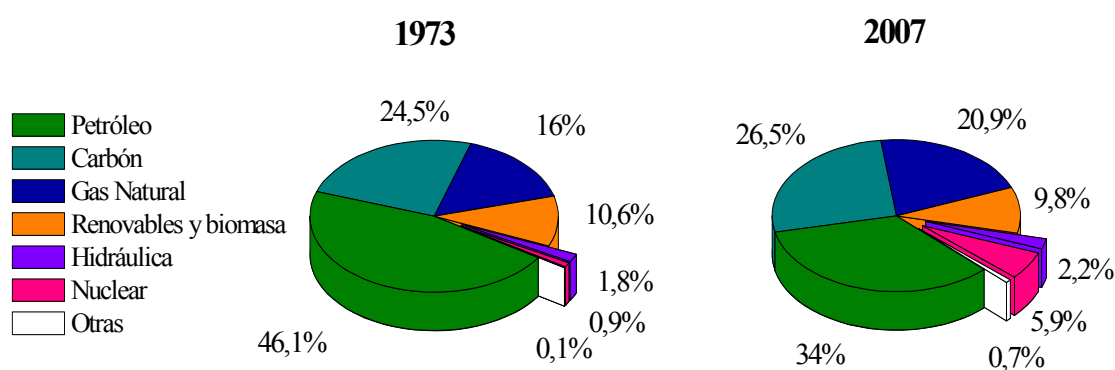


FIGURA 1.4 - Comparación de las fuentes de suministro de energía primaria en 1973 y 2007 (International Energy Agency Office, 2009).

En el caso del petróleo, que continúa cubriendo en la actualidad la mayor parte de la demanda energética, se consumieron 3952,8 Mtep a nivel mundial en el año 2007. En la Figura 1.5 se muestra la evolución del consumo de energía procedente de este combustible en distintas regiones durante los últimos 44 años. A pesar de que Europa y América del Norte han ocupado históricamente los primeros puestos en consumo de energía obtenida a partir del petróleo, las regiones en que el consumo experimenta un crecimiento más pronunciado son Asia Oriental y Oceanía. Por el contrario, Europa y Rusia, han experimentado una reducción en el consumo de energía procedente del petróleo desde 1979 (British Petroleum, 2007).

El empleo de esta fuente de energía sigue una tendencia creciente y se espera que la demanda de energía procedente del petróleo siga aumentando, como se muestra en la Figura 1.6 (Energy Information Agency, 2009), confirmado la dependencia energética mundial de este combustible que se ha comentado.

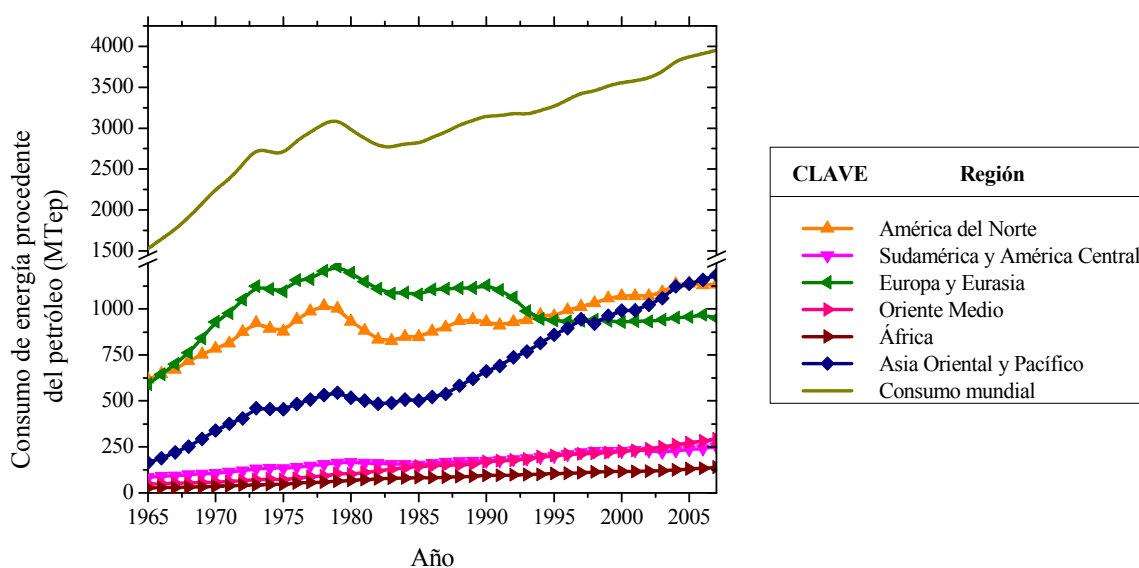


FIGURA 1.5 - Evolución del consumo de energía procedente del petróleo en diferentes regiones del planeta entre 1965 y 2007. (British Petroleum, 2007)

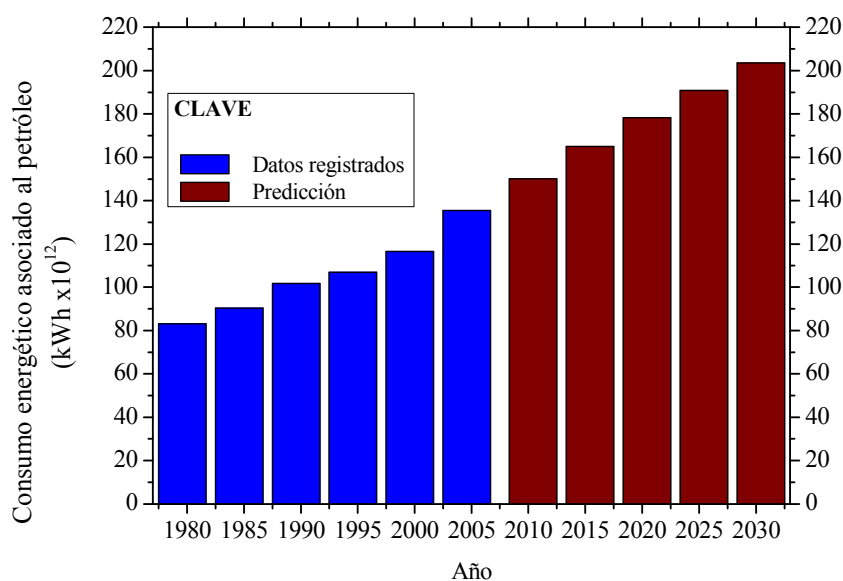


FIGURA 1.6 - Evolución y predicción de la demanda de energía procedente del petróleo hasta 2030 (Energy Information Agency, 2008).

1.1 El problema del azufre en los combustibles fósiles

Esta alta dependencia de los combustibles fósiles y las crecientes necesidades de energía de la población, desembocan en la emisión de diferentes gases, entre ellos, óxidos de azufre y de nitrógeno, por la combustión del carbón y los derivados del petróleo. Estos gases producen conocidos efectos negativos, que además tienen importantes consecuencias a nivel económico (Ohshiro e Izumi, 1999; Monticello, 2000; Le Borge y Quintero, 2003; Gupta y col., 2005; Soleimani y col., 2007).

1.1.1 CAUSAS NATURALES Y ANTROPOGÉNICAS DE LA EMISIÓN DE ÓXIDOS DE AZUFRE

En particular, los óxidos de azufre son causa de diferentes problemas que afectan al medio, la salud de las personas y la integridad de los materiales. Existen diferentes procesos propios de la actividad normal del planeta que generan diferentes compuestos azufrados (Bates y col., 1992), sin embargo, las actividades humanas son las principales responsables de la liberación de estos compuestos.

- **Fuentes naturales**

La actividad biológica y la descomposición fotoquímica sobre la superficie de las aguas marinas dan como resultado la producción de diferentes compuestos volátiles azufrados (CH_3SCH_3 , CS_2 , CH_3SH , CH_3SCH_3). Por otro lado, la descomposición de la materia orgánica en pantanos, humedales y zonas con aguas estancadas genera importantes cantidades de H_2S y dimetilsulfuro (CH_3SCH_3). También, aunque en menor medida, las corrientes de agua dulce son responsables de la generación de CH_3SCH_3 (Bates y col., 1992). Por otro lado, el azufre es un nutriente esencial para las plantas, que son capaces de tomar diferentes sulfatos a través de las raíces y compuestos volátiles azufrados, como SO_2 a través de las hojas, de forma que el exceso de azufre es excretado en forma de compuestos azufrados volátiles (Bates y col., 1992).

Además de las fuentes biogénicas mencionadas, las emisiones volcánicas son las principales responsables de la liberación de SO_2 , sulfatos y sulfuro de hidrógeno (Bates y col., 1992). Por otro lado, la emisión de óxidos de azufre tiene lugar por desorción de compuestos azufrados retenidos en suelos, bien a lo largo del tiempo por descomposición de la materia orgánica, bien por la acumulación de compuestos generados por la acción del hombre (Bates y col., 1992; MacDonald y col., 2004). Finalmente, los incendios, que puede tener su origen tanto en causas naturales como antropogénicas, constituyen una considerable fuente de compuestos azufrados a la atmósfera a causa de la combustión de biomasa (Bates y col., 1992).

- **Fuentes antropogénicas**

En la Tabla 1.1 se muestra la concentración de diferentes compuestos azufrados en varias zonas de la biosfera (Finlayson-Pitts y Pitts, 2000). A pesar de esta diversidad de fuentes naturales no directamente asociadas al hombre, la mayoría de los compuestos azufrados emitidos tienen un origen antropogénico (Finlayson-Pitts y Pitts, 2000). Como se refleja en la Tabla 1.2, alrededor del 75% del azufre emitido a la atmósfera tiene origen en actividades humanas, relacionadas con la obtención de energía a partir de combustibles fósiles, y en menor medida, con las actividades industriales dedicadas a la obtención de metales. A las causas humanas, le sigue en importancia la actividad de los océanos y las erupciones volcánicas. Se ha estimado que más del 90% del azufre contenido en el petróleo y el carbón se emite a la atmósfera en forma de SO_2 durante procesos de combustión (Monticello y Finnerty, 1985).

TABLA 1.1 - Concentración de diferentes compuestos azufrados en la atmósfera (Finlayson-Pitts y Pitts, 2000).

Compuesto	Localización	Concentración media (ppb)
H_2S	Capas superficiales marinas	3.6-7.5
	Regiones costeras	65
	Bosques	35-60
	Humedales	450-840
	Áreas urbanas	365
	Troposfera (2-5km)	6-8.5
CH_3SCH_3	Capas superficiales marinas	80-110
	Capas superficiales continentales	8-60
	Troposfera (2-5km)	1.5-15
CS_2	Capas superficiales marinas	2-18
	Capas superficiales continentales	35-120
	Troposfera (2-5km)	5-7
$\text{O}=\text{C}=\text{S}$	Troposfera (total)	500
	Capas superficiales marinas	500
	Capas superficiales continentales	545
SO_2	Capas superficiales marinas	20
	Troposfera (>5 km)	
	Europa/ Mar del Norte/ Ártico	50
	América del Norte	160
	Costa europea	260
	Aire continental contaminado	1500

TABLA 1.2 - . Emisiones globales de componentes azufrados en 1980 (Finlayson-Pitts y Pitts, 2000).

Fuente	Emisiones de azufre (Tg/año)
Combustibles / Actividades industriales	77.6
Combustión de biomasa	2.3
Erupciones volcánicas	9.6
Biosfera marina	11.8
Biosfera terrestre	0.9
Total	102.2

A causa de su origen biológico, los combustibles fósiles contienen diferentes compuestos azufrados y nitrogenados. El contenido en azufre es diferente según el origen del combustible. En el caso del carbón, la proporción de azufre varía entre el 5% y el 11% en peso (Monticello y Finnerty, 1985), como se puede observar en la Tabla 1.3.

En el caso del petróleo, por detrás del carbono y el hidrógeno, el azufre es el elemento más abundante (Kropp y Fedorak, 1998). Su presencia es mayor en las fracciones de mayor punto de ebullición (Kropp y Fedorak, 1998). La cantidad de azufre presente en el crudo se encuentra entre el 0,03 y 7,89% en peso, formando parte de compuestos inorgánicos e inorgánicos (Soleimani y col., 2007). El azufre elemental, la piritita y el sulfuro de hidrógeno constituyen las formas inorgánicas en las que se encuentra este elemento. Los compuestos orgánicos en que se presenta el azufre son generalmente formas aromáticas o saturadas de tioles, sulfuros y heterociclos, como se observa en la Figura 1.7 (Soleimani y col., 2007).

En la Unión Europea las emisiones de óxidos de azufre en 2007 alcanzaron 7.946.000 t (European Environment Agency, 2008a). Se ha estimado que las actividades humanas relacionadas directamente con la generación de estos óxidos son, principalmente, la producción de energía eléctrica y térmica (58.4%) y las actividades industriales transformadoras, seguidas del refinado de petróleo y las actividades domésticas, como se observa en la Figura 1.8. Como se comentará más adelante, las emisiones azufradas dan lugar a la formación de aerosoles de gran impacto en el medio. Estos aerosoles contienen materia particulada en suspensión, causada principalmente por el tráfico rodado y las actividades domésticas e industriales, como se refleja en la Figura 1.9 (European Environment Agency, 2008b).

TABLA 1.3 - Contenido de azufre en algunos carbones (Monticello & Finnerty, 1985).

Origen	% azufre	Origen	% azufre
Francia	0.8-1.4	Gran Bretaña	1.0-3.6
Países bajos	1.0-3.0	India (Assam)	6-8
Alemania del Este	1.3-1.5	Este de los EE.UU.	0.2-7
Bélgica	0.5-4.5	Oeste de los EE.UU.	0.2-1
Polonia	0.5-2.8		

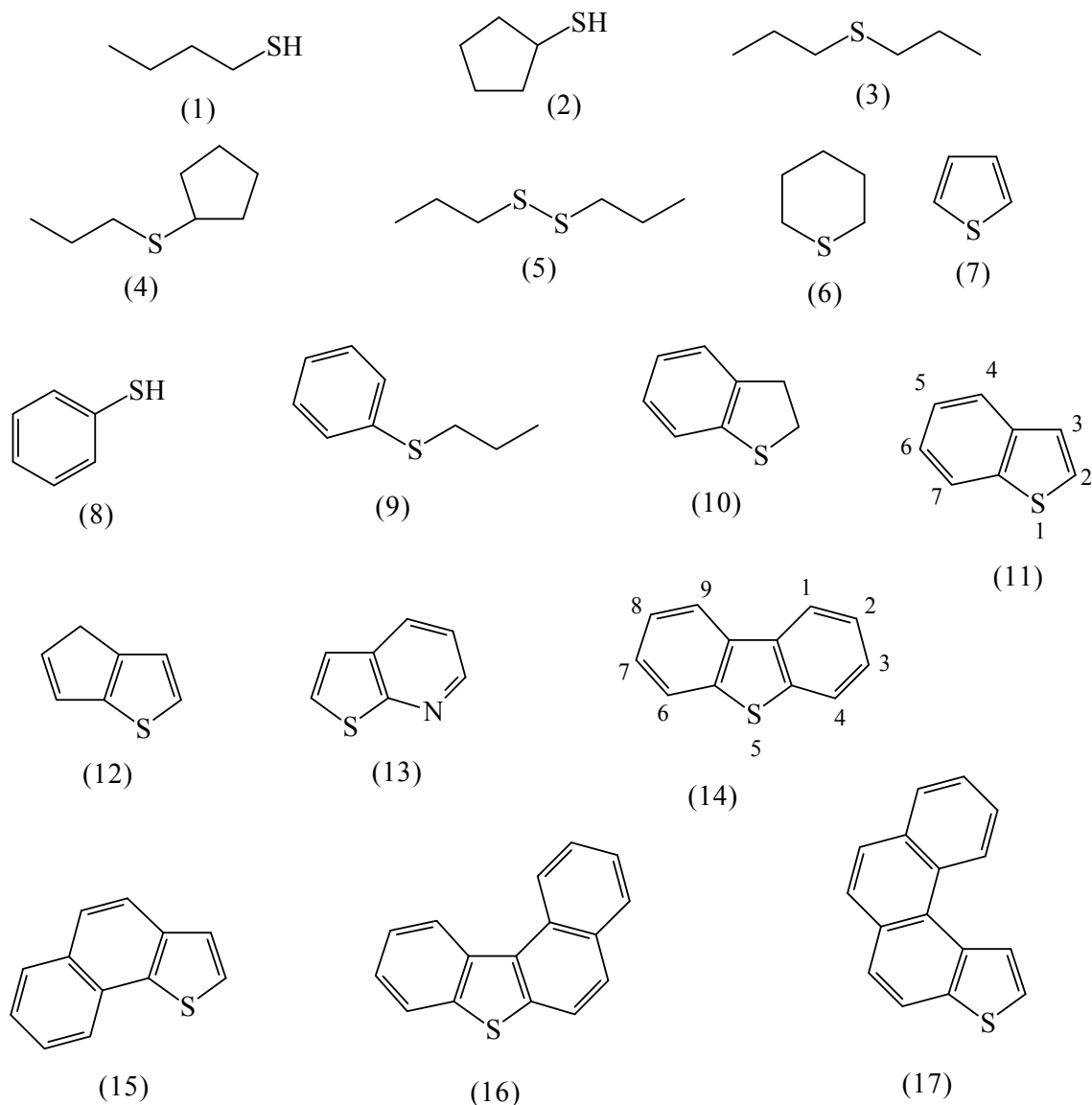


FIGURA 1.7- Estructuras representativas de distintos derivados de azufre que se encuentran en el petróleo. 1, alcano tioles; 2, cicloalcano tioles; 3, sulfuros dialquílicos; 4, sulfuros alquil-cicloalquílicos; 5, polisulfuros; 6, sulfuros cíclicos; 7, tiofenos; 8, areno tioles; 9, sulfuros aril-alquílicos; 10, tiaindanos; 11, benzotiofenos, 12, tienotiofenos; 13, tienopiridinas; 14, dibenzotiofenos; 15, naftotiofenos; 16, benzonaftotiofenos; 17, fenantrotiofenos.

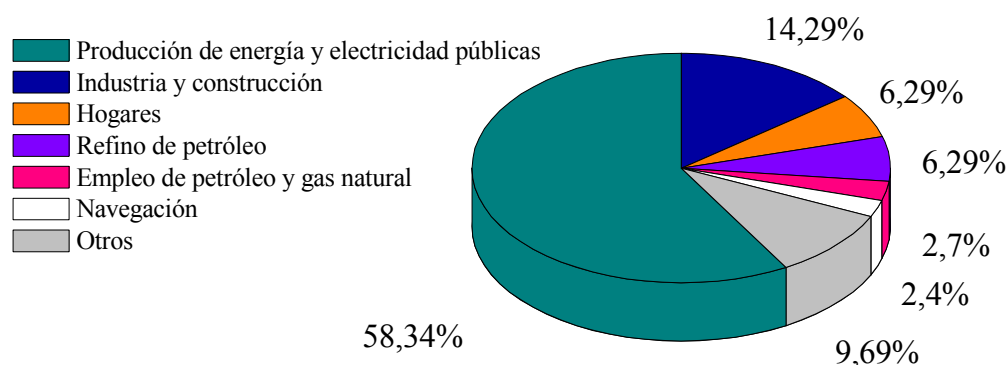


FIGURA 1.8 - Contribución de diferentes factores y actividades a la generación de óxidos de azufre (European Environment Agency, 2008b).

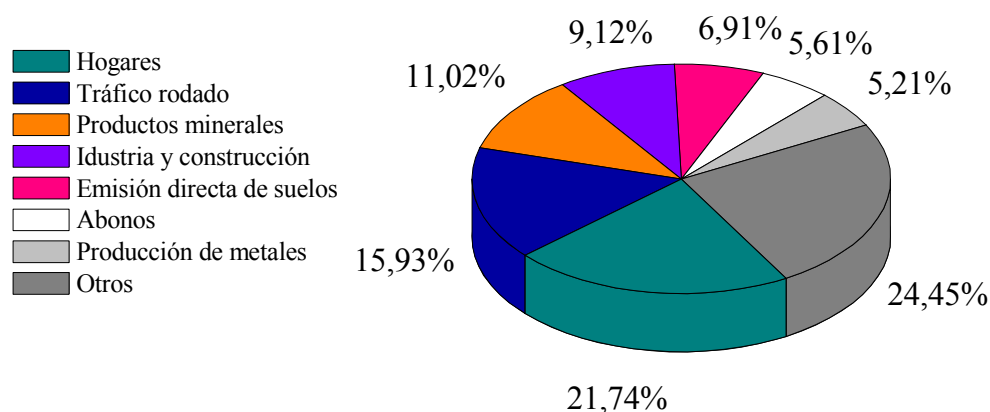


FIGURA 1.9 -Contribución de diferentes factores y actividades a la generación de materia particulada PM₁₀ (European Environment Agency, 2008b).

1.1.2 EFECTOS DE LOS ÓXIDOS DE AZUFRE

Como se ha comentado previamente, las emisiones de óxidos de azufre tienen un carácter nocivo y afectan negativamente a diferentes aspectos como el medio ambiente, la salud humana, los materiales, la visibilidad y por tanto tienen una amplia repercusión económica (Environmental Protection Agency, 2007, Soleimani y col., 2007).

- **Sobre el medio ambiente**

Uno de los principales problemas que causan los óxidos de azufre, junto con los óxidos de nitrógeno, es la lluvia ácida. Estos compuestos constituyen la principal causa de la acidificación, tanto del suelo, como de las aguas, ya que su oxidación genera ácido sulfúrico y nítrico en el agua de lluvia, ya sea en fase gaseosa o acuosa.

En particular, el SO₂ emitido se puede transformar en SO₃ en las condiciones oxidantes de la atmósfera (Castillo, y col., 2007), principalmente por acción de radicales OH· o por el ozono presente. El trióxido de azufre con el vapor de agua se transforma en ácido sulfúrico, que pasa a la forma acuosa.

- $\text{SO}_2 + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{HSO}_3\cdot$
- $\text{HSO}_3\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_3 + \text{HOO}\cdot$
- $\text{SO}_2 + \text{O}_3 \rightarrow \text{SO}_3 + \text{O}_2$
- $\text{SO}_3(\text{g}) + \text{H}_2\text{O}(\text{v}) \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4(\text{g})$
- $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{g}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4(\text{ac})$

Este ácido también puede generarse en fase acuosa, puesto que el SO₂ es soluble en agua.

- $\text{SO}_2(\text{g}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{SO}_2(\text{ac})$
- $\text{SO}_2(\text{ac}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{HSO}_3^-$
- $\text{HSO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{SO}_3^{2-}$
- $\text{HSO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

En condiciones normales, la presencia de óxidos de azufre y nitrógeno dan lugar a la formación de los correspondientes ácidos, por disolución en el agua, sin que estos ácidos tengan un efecto relevante en la reducción del pH del agua de lluvia. Este agua se tiene un valor de pH alrededor de 5,6 por la disolución del CO₂ presente. El aumento de actividades humanas, que generan compuestos de azufre y nitrógeno oxidados en grandes cantidades, provoca el descenso del pH del agua de lluvia y la niebla hasta valores en torno a 2,3 (Castillo, y col., 2007).

Es necesario resaltar dos fenómenos relacionados con la lluvia ácida que tienen lugar. Por un lado, la llamada “deposición húmeda”, que consiste en la transferencia de estos compuestos ácidos a través de la lluvia, la nieve o la niebla a los suelos, las plantas y los medios acuáticos. Por otro lado, la “deposición seca” consiste en la transferencia

de sulfatos, generalmente, en la materia en suspensión en el aire, en ausencia de agua, sobre los bosques, edificios y terrenos. Por esta razón, también se conoce al fenómeno de la lluvia ácida con el término general de deposición ácida, siendo la deposición seca, tan dañina para el medio ambiente como la líquida (Environmental Protection Agency, 2007).

Las repercusiones de la lluvia ácida no sólo tienen lugar en las inmediaciones del foco emisor. Los compuestos que causan la deposición ácida tienen una vida media en la atmósfera de entre dos y seis días. El viento puede causar su dispersión y alcanzar distancias de cientos de kilómetros (Castillo, y col., 2007, Soleimani y col., 2007).

Los efectos de la deposición ácida sobre los suelos son determinantes, sobre todo en aquellos poco erosionables, debido a la carencia de sustancias básicas, como materiales calcáreos, basálticos, feldespatos, etc, capaces de neutralizar sus efectos. La capacidad del suelo para compensar la deposición ácida depende también de la cantidad de humus presente, que actúa como intercambiador iónico y tiene un efecto tampón. La reducción del pH de los suelos incide directamente en la solubilización de metales tóxicos y en la pérdida de nutrientes del suelo por lixiviación (Haines, 1986), que provoca el arrastre de los iones metálicos presentes en el medio. Esto aumenta la absorción de iones tóxicos de mayor movilidad por parte de los vegetales, y así su entrada en la cadena alimentaria. Por otro lado, los nutrientes (Ca, K, Mg, etc) son menos accesibles a causa de ese mismo arrastre. Además, los aluminosilicatos se disuelven y, posteriormente el ion aluminio inhibe el crecimiento de las plantas porque se fija en lugar de otros iones esenciales.

La vegetación, por tanto, se ve afectada por esta pérdida de nutrientes disponibles y el aumento de la concentración de metales tóxicos para el crecimiento. De esta manera, se ha observado que las plantas más jóvenes son las más vulnerables ante la deposición ácida, provocando, además, que las plantas sean más fácilmente atacables por plagas (Henry y Heinke, 1999).

La acidificación de los medios acuáticos supone la reducción de la población de peces y la muerte de la flora menos resistente a bajos pH de estos ecosistemas. No sólo se ven afectados por la acidificación de las aguas, sino también por el aumento de la concentración de metales nocivos movilizados (Haines, 1986).

Por otro lado, los óxidos de nitrógeno y de azufre emitidos a la atmósfera pueden sufrir diferentes reacciones con otros compuestos presentes en el aire, y formar

aerosoles, que constituyen la llamada “materia particulada”. Esta materia particulada se ha relacionado con la pérdida de la visibilidad y daños en la vegetación (Environmental Protection Agency, 2007).

En la Figura 1.10 se muestra la contribución de las diferentes actividades humanas a la generación de agentes causantes (los óxidos de azufre y de nitrógeno entre otros) de la lluvia ácida y la materia particulada. El transporte, la generación de energía y las actividades industriales son los principales responsables de estos efectos.

- **Sobre la salud humana**

En las personas, los efectos nocivos del dióxido de azufre se producen fundamentalmente por inhalación o por contacto directo con las mucosas. Las personas más susceptibles son las que padecen asma, insuficiencia respiratoria o problemas cardiovasculares. Los niños, las personas mayores y quienes están afectados por dolencias respiratorias, constituyen la población de riesgo. Aunque no existen pruebas definitivas de que el dióxido de azufre provoque enfermedades respiratorias, se ha encontrado una correlación específica entre la concentración de óxidos de azufre en la atmósfera y el índice de muertes de personas que padecen enfermedades crónicas cardiovasculares y respiratorias (United States National Library of Medicine, 2008).

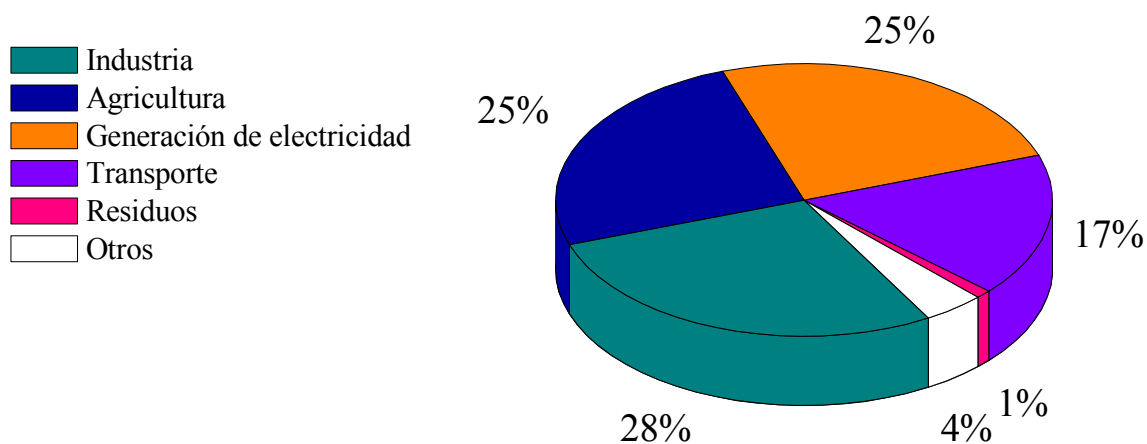


FIGURA 1.10 - Contribución de diferentes actividades humanas a la emisión de agentes acidificantes (European Environment Agency, 2008b).

La exposición al dióxido de azufre en el ambiente, se ha asociado a la reducción de la función pulmonar, además de aumentar la incidencia de síntomas y enfermedades respiratorias. El contacto con este gas provoca irritación en la piel, ojos y mucosa del aparato respiratorio. Tanto el SO₂ presente en los aerosoles sulfúricos (formados por la reacción del dióxido de azufre con otras sustancias presentes en la atmósfera), como el SO₂ adsorbido sobre la materia particulada presentan estos efectos nocivos. Por su gran solubilidad, el dióxido de azufre es capaz de disolverse en los fluidos acuosos del sistema respiratorio superior y pasar al torrente sanguíneo, causando acidosis metabólica (United States National Library of Medicine, 2008).

Los efectos agudos a una exposición al dióxido de azufre provocan irritación del tracto respiratorio, tos, dificultad al tragar, eritema orofaríngeo y en algunos casos, episodios convulsivos y neuritis periférica. Se puede causar la destrucción del epitelio ciliado que protege el tracto respiratorio, y presentarse una invasión bacteriana pulmonar. La exposición a concentraciones elevadas puede provocar el cierre de la glotis, y una exposición prolongada causa enfisema, y bronquitis crónica (United States National Library of Medicine, 2008).

La materia particulada está formada por un aerosol de partículas sólidas y gotas de líquido en el aire. En particular, las partículas de diámetro inferior a 10 micras (PM₁₀) pueden ser inhaladas y alcanzar los pulmones. Cuanto menor es su tamaño, mayor es el daño que pueden causar en el aparato respiratorio, pudiendo llegar incluso al torrente sanguíneo. Los problemas que pueden causar o agravar son la irritación de las vías aéreas, tos, dificultad respiratoria, asma, bronquitis crónica, arritmias, infarto cardíaco y complicaciones en personas con enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Environmental Protection Agency, 2007).

- **Sobre los materiales y los recursos tecnológicos**

Los monumentos y construcciones basadas, sobre todo, en piedra caliza y mármol sufren un deterioro a causa de la acción disolvente de la deposición ácida. También, los recubrimientos de superficies son más fácilmente atacables bajo la acción de la lluvia ácida. La presencia de azufre en los combustibles es causa de corrosión de los materiales, de tuberías y de circuitos, además de provocar el deterioro de los catalizadores de reformado por envenenamiento. (Yu y Shaw, 1998; Bhatia y Sharma, 2006; Soleimani y col., 2007, Environmental Protection Agency, 2007).

1.1.3 LEGISLACIÓN

A la vista de los problemas asociados a la emisión de óxidos de azufre, diferentes Estados han impuesto regulaciones cada vez más estrictas en cuanto al contenido máximo de azufre en los combustibles (McFarland, 1999; Ohshiro e Izumi, 1999; Monticello, 2000; Le Borge y Quintero, 2003; Gupta y col., 2005; Bhatia y Sharma, 2006; Soleimani y col., 2007).

La Unión Europea, en la Directiva 96/62/CEE (Unión Europea, 1996) establece las primeras medidas para poner de acuerdo a los Estados Miembros en lo que se refiere a los objetivos, criterios y métodos para establecer un sistema de evaluación y gestión de la calidad del aire. Se establecen las bases para que se fijen los valores umbrales de alarma y valores límite en las concentraciones de diferentes compuestos como benceno, cadmio, arsénico, mercurio, monóxido de carbono, materia particulada, sólidos en suspensión, y dióxido de azufre. Así, en la Directiva 99/30/CE (Unión Europea, 1999), se establecen los valores límite y umbral para estos contaminantes, y los criterios de medida.

La Directiva 93/12/CEE (Comunidades Europeas, 1993) prohibió en la Unión Europea combustibles para automóviles con un contenido en azufre superior al 0,2 % en peso para 1994. En particular, esta directiva limita para 1996 la comercialización de combustibles diesel con un contenido en azufre superior a 0,05% en peso.

En lo que se refiere a vehículos de automoción, la Unión Europea ha desarrollado el Programa Auto-Oil (I y II) en relación a vehículos de automoción. Este programa parte de la Directiva 94/12/CEE (Unión Europea, 1994), cuyo objeto consiste en aplicar diversas medidas para la reducción de la emisión de contaminantes del sector del transporte rodado (especialmente turismos).

Además de esta iniciativa, en materia de legislación europea, se ha llegado a desarrollar un conjunto amplio de normativa. Es el caso de la Directiva 98/69/CE (Unión Europea, 1998), relativa a las medidas que deben adoptarse contra la contaminación atmosférica causada por las emisiones de los vehículos a motor (de aplicación a vehículos ligeros, diésel y gasolina), y por la Directiva 98/70/CE (Unión Europea, 1998), relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo. Esta última Directiva ha sido modificada por la Directiva 2003/17/CE (Unión Europea, 2003).

En la Directiva 98/70/CE se limitó la comercialización de combustible diésel en el territorio de los Estados miembros, a partir del 1 de enero de 2000, a productos de con un contenido máximo de 350 ppm de azufre. Desde esa misma fecha, se debía disponer de combustible que no superase los 50 ppm de azufre. A partir del 1 de enero de 2005, se prohibía comercializar combustible diésel con un contenido superior a los 50 mg/kg de azufre. Esta directiva se traspuso a la legislación española como Real Decreto 1728/1999 (España, 1999), de 12 de noviembre, por el que se fijaron las especificaciones de los gasóleos de automoción y de las gasolinas

La Directiva 2003/17/CE modificó la directiva anterior y dispuso que en los Estados Miembros debiera disponerse de combustible diésel de contenido máximo de 10 ppm de azufre a partir del 1 de enero de 2005 y como plazo máximo el 1 de enero de 2009. A partir de esta fecha, 1 de enero de 2009, todo el combustible diésel comercializado en el territorio de los Estados Miembros debe tener un contenido máximo de azufre de 10 mg/kg. Esta directiva ha sido transpuesta en España como Real Decreto 1700/2003 (España, 2003).

La preocupación por el diésel reside en el alto contenido en compuesto azufrados que presenta esta fracción petrolífera (Bhatia y Sharma, 2006; Soleimani y col., 2007).

Otras naciones, como Estados Unidos, Canadá y Japón han seguido políticas paralelas. En 1993, tanto Canadá como Estados Unidos fijaron el contenido máximo de azufre en 500 ppm para el diésel (Soleimani y col., 2007). Japón fijó este mismo límite en 1997 (Ohshiro e Izumi, 1999). En 2005, Estados Unidos redujo este valor a 30 ppm, Canadá a 15 ppm (Soleimani y col., 2007) y Japón a 50 ppm. De la misma manera, Estados Unidos y Canadá limitarán el contenido en azufre de sus combustibles fósiles hasta 10 ppm en 2010 (Soleimani y col., 2007).

1.2 Soluciones tecnológicas para la eliminación del azufre

Se invierten muchos esfuerzos en los últimos años para desarrollar tecnologías que eviten estos problemas en su origen, previamente a su empleo para producir energía, a raíz de la gran dependencia de los combustibles fósiles. En este sentido, se han desarrollado diferentes tecnologías para la eliminación de azufre, basadas en operaciones de separación, transformaciones químicas o sistemas biológicos (Babich y Moulijn, 2003; Soleimani y col. 2007).

Las técnicas de desulfuración se pueden emplear antes o después de la combustión. Puesto que la aplicación de sistemas de desulfuración no es aplicable a todos los sistemas de combustión, y es preferible prevenir en origen los problemas de corrosión que generan los compuestos azufrados, parece más ventajoso eliminar el azufre del combustible antes de su empleo (Soleimani y col., 2007).

El objetivo de estas tecnologías es cumplir, a la vez, con las restricciones legales, cada vez más exigentes, que los países imponen en lo referente al contenido en azufre en los combustibles, y con los requisitos de calidad de estos productos. Las diferentes tecnologías que se han ido proponiendo se pueden clasificar según estén basadas en la descomposición química de los compuestos azufrados, en operaciones de separación y transformación de estos compuestos azufrados (Babich y Moulijn, 2003), o bien, en el empleo de sistemas biológicos con capacidad desulfurante.

En el primer grupo se encuentran las técnicas basadas en el proceso tradicional de hidrodesulfuración (HDS). Consiste en una hidrogenación catalítica a presiones (1-20 MPa) y temperaturas elevadas (290-455 °C) (McFarland, 1999) para transformar los compuestos azufrados en H₂S empleando, sobre todo, catalizadores de CoMo/Al₂O₃, y NiMo/Al₂O₃. Si bien, diferentes compuesto organosulfurados, en particular los dibenzotiofenos y sus derivados, presentan gran estabilidad y resistencia a ser transformados mediante esta técnica (Ohshiro e Izumi, 1999; Le Borge y Quintero, 2003; Hernández-Maldonado y Yang, 2004).

En el segundo grupo, se encuentran otras tecnologías basadas en métodos fisico-químicos, en las que no se emplea el hidrógeno para desulfurar. Por ejemplo, la alquilación de compuestos tiofénicos permite transformar los compuesto organosulfurados en otros de mayor punto de ebullición. De esta manera, se pueden separar del combustible mediante una etapa posterior de destilación convencional. Se

trata de un proceso que emplea catalizadores ácidos (BF_3 , AlCl_3 , ZnCl_2 o SbCl_5) soportados en alúmina, sílice o sílice-alúmina. Se logran productos de muy bajo contenido en azufre (hasta 20 ppm) afectando muy levemente a la calidad del combustible. Sin embargo, la eliminación definitiva del azufre presente en los compuestos alquilados que se retiran requiere condiciones de operación muy severas y costosas (Babich y Moulijn, 2003).

Dentro de este segundo grupo de técnicas, se encuentra la desulfuración extractiva, que se basa en la mayor solubilidad de los compuestos organosulfurados en algunos disolventes, frente al resto de hidrocarburos presentes en las fracciones que se desean tratar. Se han empleado acetona, etanol, polietilenglicol y diferentes disolventes nitrogenados, con los que se han obtenido eliminaciones de azufre entre el 50 y el 90%, según el número de ciclos de extracción empleados. Las mejoras en el rendimiento de este proceso se dirigen, en la actualidad, hacia la oxidación previa de estos compuestos azufrados, para aumentar su polaridad y, así, su solubilidad en dichos disolventes (Babich y Moulijn, 2003). La viabilidad del proceso está condicionada por la cinética de la oxidación y los costes de esta etapa.

La precipitación de los compuestos organosulfurados, es una opción dentro de este conjunto de procesos físico-químicos. Sin embargo, su bajo rendimiento, la necesidad de operaciones de separación y el reducido conocimiento de este proceso, limita sus aplicaciones en la desulfuración. Por otro lado, se ha propuesto, desde hace 30 años, la aplicación de distintos agentes oxidantes para someter a una oxidación selectiva a estos compuestos azufrados, y someterlos después a una descomposición térmica. Este método ha presentado una baja eficiencia (Babich y Moulijn, 2003).

La adsorción de los compuestos azufrados es otra propuesta estudiada (Babich y Moulijn, 2003; Hernández-Maldonado y Yang, 2004; Ágeda, 2006). La principal limitación de este método tiene que ver con la sobrecarga del adsorbente al emplear corrientes de elevado contenido en azufre en las refinerías. Los retos de esta tecnología se centran en la mejora en la capacidad y la composición de estos adsorbentes, y en el desarrollo de sistemas de adsorción reactiva (Babich y Moulijn, 2003).

Finalmente, dentro de este grupo, el empleo de líquidos iónicos en la desulfuración es una de las técnicas en estudio en las que se pone gran interés, por la posibilidad de permitir la extracción selectiva de los compuestos azufrados difíciles de separar por otros medios, en condiciones moderadas de presión y temperatura (Esser y

col., 2004). Consiste en el empleo de sales orgánicas, estables a temperaturas inferiores a 100 °C, que se pueden combinar para optimizar la separación selectiva de los compuestos de interés. Esto permitiría reducir el consumo energético y las emisiones de CO₂ asociadas a otras tecnologías, como la HDS. Sin embargo, la recuperación de líquidos iónicos en el proceso es complicada y requiere el empleo de disolventes (Soleimani y col., 2007).

En un tercer grupo, se reúnen los procesos de biodesulfuración (BDS), referidos a las técnicas que emplean microorganismos, extractos celulares o enzimas, para la eliminación del azufre. (de Ranson y Rivas, 1999; Setti y col., 1997) Aunque, en general, la bibliografía se refiere casi exclusivamente al empleo de microorganismos (Malik, 1978; Kropp y Fedorak, 1998; McFarland, 1999).

1.2.1 LIMITACIONES DE LA HIDRODESULFURACIÓN

La HDS es un proceso muy bien conocido e implantado en las refinerías desde hace tiempo (Ohshiro e Izumi, 1999; Gupta y col., 2005; Soleimani y col., 2007). Como se ha comentado previamente, consiste en la hidrogenación catalítica y selectiva del combustible a altas temperaturas y presiones de hidrógeno. Estas condiciones de operación deben ser severas para alcanzar altos niveles de desulfuración, lo que se traduce en elevadas inversiones económicas a la hora de eliminar compuestos organosulfurados de gran complejidad y aromaticidad (McFarland, 1999; Soleimani y col., 2007). Los retos para mejorar esta tecnología se centran en desarrollar mejores catalizadores, buscando las mejores actividad y selectividad (en función de su composición en especies activas, soporte, ruta de síntesis,...), y resistencia tanto al envenenamiento, como a presiones y temperaturas de operación más drásticas (Babich y Moulijn, 2003)

Los costes para mejorar el proceso aumentan para cumplir los requisitos cada vez más exigentes de las legislaciones en materia de contenido máximo de azufre, tanto en el caso de adaptar una instalación antigua, como en el de construir unidades nuevas para este objetivo (Babich y Moulijn, 2003). Por otro lado, las repercusiones económicas son importantes a causa de trabajar a presiones y temperaturas elevadas, por la necesidad de emplear equipos de mayor espesor de pared y materiales más resistentes a la corrosión, por necesitar sistemas de control más sofisticados y por requerir mayores

gastos en hidrógeno (Bhatia y Sharma, 2006). Además, el aumento de la severidad de las condiciones, implica consumos energéticos muy elevados y mayores emisiones de CO₂ (Kobayashi, y col., 2001).

La tendencia general se dirige, a tratar fracciones más pesadas (Bhatia y Sharma, 2006; Kilbane, 2006), que presentan un mayor contenido en azufre (Soleimani y col., 2007), sobre todo en forma de benzotiofenos (Kropp y Fedorak, 1998), siendo la mayor proporción de dibenzotiofenos y sus derivados de éstos (Finnerty y Robinson, 1986; Le Borge y Quintero, 2003). Estos compuestos son muy estables y resistentes a ser transformados mediante HDS, sobre todo los derivados alquilados de DBT en posiciones 4 y/ó 6, siendo los costes necesarios para su eliminación mediante HDS prohibitivos (Ohshiro e Izumi, 1999; Le Borge y Quintero, 2003; Van Hamme y col., 2003; Soleimani y col., 2007)

Por estos motivos, se proponen diferentes vías para la mejora de la hidrodesulfuración. La HDS avanzada apuesta por mejoras en el diseño de los catalizadores (optimización de las especie activas, selección del soporte y desarrollo de la ruta de preparación), así como en el diseño del reactor (sistemas de contacto en contracorriente, en lecho fluidizado, etc) o la combinación con otros sistemas reactivos, o procesos basados en destilación catalítica, que impidan la caída en el contenido en aromáticos y la pérdida de características de producto final (Babich y Moulijn, 2003).

1.3 Biodesulfuración

La desulfuración microbiana, desulfuración biológica o biodesulfuración (BDS), es definida como la aplicación de la Biotecnología que consiste en la eliminación del azufre mediante el empleo de un sistema biológico vivo, o partes de un organismo (Monticello y Finnerty, 1985; Setti y col., 1997; de Ranson y Rivas, 1999; Le Borge y Quintero, 2003; Gupta y col., 2005). Existe algún autor que limita esta definición al empleo de microorganismos que sean capaces de oxidar selectivamente los átomos de azufre mediante la ruptura exclusiva de enlaces carbono-azufre (Bhatia y Sharma, 2006), debido a que, como se explica más adelante, los mejores sistemas de eliminación del azufre en los combustibles fósiles son aquéllos que no afectan a su estructura carbonada y, por tanto, a su valor calorífico (Gupta y col., 2005).

En los estudios de desulfuración publicados en la literatura, se utiliza el dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados alquilados como compuestos modelo por dos motivos. El primero de ellos es su gran abundancia en los combustibles fósiles, puesto que representan alrededor del 70% del azufre presente en ellos (Kertesz y Wirtek, 2001; Le Borge y Quintero, 2003), y particularmente en el petróleo, donde la cantidad de DBT y sus derivados aumenta en las fracciones más pesadas, como se observa en la Figura 1.11 (Kropp y Fedorak, 1998; McFarland, 1999). La segunda de las razones para emplear estos compuestos como modelo, es que, a causa de su estabilidad, presentan cierta dificultad para ser eliminados mediante diferentes técnicas, particularmente mediante HDS (Monticello y Finnerty, 1985; Setti y col., 1997; McFarland, 1999). De esta manera, se emplean estos compuestos como representantes de los compuestos organosulfurados heterocíclicos que permanecen tras un proceso de HDS (Gallagher y col., 1993; Folsom y col., 1999; Ohshiro e Izumi, 1999; Bhatia y Sharma, 2006), y se han convertido en los compuestos modelo para estudios de BDS tras descubrirse numerosas cepas microbianas con capacidad para utilizarlos como fuente de azufre (Kilbane, 2006).


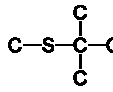
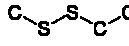
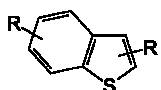
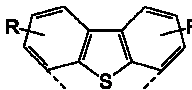
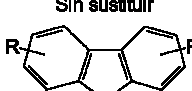
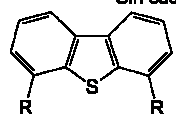
TIPOS DE COMPUSTIBLES FÓSILES	CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS	ESTRUCTURA QUÍMICA	PUNTO DE EBULLICIÓN
<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 20px;">Gasolina</div> <div style="margin-bottom: 20px;">Queroseno</div> <div>Diésel</div> <div>Crudo</div> </div>	Compuestos no-tiofénicos	$R-S$ $R-S-R$ $R-S-S-R$	
	Tiofenos		84 °C
	Sulfuros metil-butil terciario		99 °C
	Sulfuros metil-etil		135 °C
	Benzotiofenos		219 °C
	Dibenzotiofenos sin β-sustituciones		>298 °C
	Dibenzotiofenos β-sustituídos		
	Dibenzotiofenos di-β-sustituídos		

FIGURA 1.11 - Estructuras organosulfuradas presentes en fracciones petrolíferas.

Las principales ventajas que presenta la tecnología de la biodesulfuración, en comparación con la hidrodeshulfuración, son su menor requerimiento energético y mayor eficiencia económica por emplear condiciones suaves de presión y temperatura, sin pérdida de la calidad del combustible (Folsom y col., 1999; Gupta y col., 2005). Esto implica una menor emisión de gases de efecto invernadero y generación de subproductos gracias a la selectividad de este proceso (Monticello, 2000; Van Hamme y col., 2003), Gupta y col., 2005; Soleimani y col., 2007), lo que revierte en menores costes de inmovilizado y de operación (Monticello, 2000). El empleo de biocatalizadores, por su gran especificidad de sustrato, facilidad para de obtención del catalizador, y la versatilidad de los microorganismos para el tratamiento de fracciones petrolíferas, supone una ventaja frente a las otras tecnologías propuestas (de Ranson y Rivas, 1999).

Sin embargo, la gran selectividad de estos biocatalizadores presenta un problema: no permite la eliminación de todos los compuestos azufrados por un solo microorganismo. Además, el proceso biológico, requiere de una cierta cantidad de agua, que hay que tener en cuenta para la transferencia de materia y las operaciones de separación posteriores al tratamiento (Setti y col., 1997; Van Hamme y col., 2003). Por otro lado, se necesita desarrollar biocatalizadores de mayor actividad y resistencia a la inhibición por producto (McFarland, 1999; Le Borge y Quintero, 2003). Por todos estos motivos, esta tecnología sigue en fase de estudio, y aún no se aplica a gran escala.

1.3.1 ESTADO DEL ARTE DE LA BDS

La idea de eliminar el azufre presente en los combustibles mediante métodos biológicos aparece a mediados del siglo XX. Las bacterias necesitan cubrir sus necesidades de este elemento para su crecimiento y el resto de su actividad biológica. De esta forma, el azufre se encuentra en la estructura de algunos de sus cofactores enzimáticos (tiamina, biotina, coenzima A, etc) y en sus aminoácidos y proteínas (cisteína, metionina, puentes disulfuro,...) (Kertesz, 1999). Así, por ejemplo, el contenido medio de azufre en la población bacteriana se encuentra entre el 0,5 y el 1% en peso. A raíz de lo anterior, se plantea la posibilidad de encontrar microorganismos capaces de utilizar compuestos resistentes a los tratamientos convencionales de HDS como fuente de azufre (Soleimani y col., 2007). Las primeras patentes en las que se

emplearon microorganismos aerobios con este fin aparecieron en 1950 (Strawinski, 1950) y 1953 (ZoBell, 1953). Desde ese momento, se llevaron a cabo varios intentos para desarrollar métodos de desulfuración microbiana, pero sin mucho éxito. En realidad, la mayoría de los sistemas microbianos propuestos llevaban a cabo una degradación de los hidrocarburos hasta productos solubles en agua, que pudieran separarse de la fracción orgánica tratada. Se trataba, más bien de métodos de biodegradación o biorremediación que no se dirigían de manera específica hacia los enlaces carbono-azufre (Ohshiro e Izumi, 1999), constituyendo un proceso destructivo que afecta al combustible. Por otro lado, aparece un segundo problema durante la primera etapa de desarrollo de la desulfuración biológica, ya que muchos de los compuestos procedentes del petróleo que son solubilizados a la fase acuosa, inhiben el crecimiento microbiano (Soleimani y col., 2007).

Durante los años 70 y 80 existe un interés creciente por encontrar microorganismos capaces de desulfurar (Ohshiro e Izumi, 1999). Aunque desde entonces se descubrieron y se desarrollaron diferentes microorganismos capaces de llevar a cabo rutas destructivas de eliminación de los compuestos azufrados (Soleimani y col., 2007), el verdadero desarrollo de la BDS surge a partir de los años 90. Aparecen entonces diferentes estudios sobre microorganismos capaces de degradar selectivamente los enlaces carbono-azufre de un compuesto modelo, DBT, sin afectar al resto de su esqueleto carbonado (Kilbane, 1990; Kilbane y Jackowski, 1992). Se presenta así, un microorganismo, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, que transforma DBT, a través de una ruta no destructiva, sin afectar a su estructura carbonada.

Tras este hito, y a raíz de la aparición, sobre todo a finales de la década de los 90, de legislaciones cada vez más restrictivas en cuanto al contenido de azufre en los combustibles, reaparece el interés por la biodesulfuración y otras tecnologías alternativas o complementarias al hidrotratamiento convencional (Ohshiro e Izumi, 1999).

Desde entonces, la biodesulfuración ha experimentado un gran desarrollo. Aunque aún no se ha logrado un proceso industrial claramente competitivo, se ha avanzado en el conocimiento de las diferentes rutas metabólicas de desulfuración, su genética y su enzimología (Kilbane, 2006). Se conocen diferentes microorganismos naturales y modificados genéticamente capaces de desulfurar determinados compuestos azufrados. Actualmente, las herramientas de Ingeniería Genética y la parcela de las

“ómicas” se han podido aplicar en la mejora de la eficacia de los biocatalizadores, desde el punto de vista de su actividad, estabilidad y selectividad (Le Borge y Quintero, 2003).

Rutas metabólicas de BDS

Entre las rutas metabólicas que emplean diferentes microorganismos para desulfurar se encuentran las anaerobias y las aerobias, y dentro de las segundas, aquellas que afectan al esqueleto carbonado de las moléculas azufradas y las que sólo degradan selectivamente los enlaces carbono-azufre (Ohshiro e Izumi, 1999; Gupta y col., 2005).

Se conocen algunas bacterias del género *Desulfovibro* capaces de desulfurar compuestos modelo en condiciones anaerobias, como DBT y dibencilsulfuro (Kim y col., 1995). En particular, *Desulfovibro desulphicans* M6 es capaz de transformar DBT en bifenilo y sulfuro de hidrógeno (Kim y col., 1990). También se han estudiado la capacidad desulfurante de *Desulfovibro longreachii* y de *Desulfomicrobium escambium* (Yamada y col, 2001). La ventaja de esta ruta es que genera el mismo compuesto que la HDS. Además, las condiciones reductoras de procesos anaerobios como estos, impedirían procesos de oxidación que generasen gomas, ácidos o compuestos coloreados en el producto final (McFarland, 1999; Gupta y col., 2005) y además se evitaría la producción de sulfato como subproducto, que habría que separar o tratar (Ohshiro e Izumi, 1999). Sin embargo, no se conocen muchos microorganismos anaerobios que puedan emplearse en un proceso de desulfuración económicamente viable, porque no se han logrado rendimientos suficientemente elevados (McFarland, 1999; Ohshiro e Izumi, 1999), por las limitaciones que existen para degradar determinados compuestos (Setti y col., 1997) y por la dificultad para mantener las condiciones de anaerobiosis a nivel industrial (Gupta y col., 2005).

Debido a las desventajas que se acaban de comentar, en la literatura predominan los procesos de desulfuración en condiciones aerobias. Se distinguen entre tres tipos de metabolismo entre las rutas aerobias para degradar DBT y otros compuestos modelo (McFarland, 1999; Ohshiro e Izumi, 1999).

El metabolismo tipo I consiste en la oxidación parcial del compuesto azufrado de partida sin afectar a los enlaces carbono-azufre, por lo que este tipo de transformaciones se denomina *degradación*, al no constituir una verdadera desulfuración; no se elimina el azufre de la estructura de partida, como se observa en la Figura 1.12. Se ha encontrado que diferentes bacterias del género *Pseudomonas* son

capaces de degradar DBT de esta manera (Yamada y col., 1968; Nakatani y col., 1968). Se trata de la conocida como ruta Kodama (Kodama y col., 1970 y 1973). Se encontraron otras bacterias del género *Pseudomonas* que llevan a cabo la degradación según esta ruta, como *Pseudomonas jiji* y *Pseudomonas abikonesis* (Kodama y col., 1970), *Pseudomonas aeruginosa* ERC-8 (Hou y Laskin, 1976), *Beijerinckia sp.* (Laborde y Gibson, 1977) y *Rhizobium melioli* (Frassinetti y col., 1998). Este tipo de metabolismo se ha estudiado en hongos como *Cunninghamella elegans* (Crawford y Gupta, 1990; Schlenk y col., 1994) y *Pleurotus ostreatus* (Bezalel y col., 1996).

El metabolismo tipo II tiene lugar en microorganismos que utilizan el compuesto azufrado de partida como fuente única de carbono, azufre y energía. Aunque el azufre presente en la molécula se elimina, la estructura carbonada se ve afectada, como se muestra en la Figura 1.12, lo que altera el valor calorífico del producto final. Entre el reducido grupo de microorganismos que emplean esta ruta se encuentran *Brevibacterium sp.* (Van Affender y col., 1990) y *Arthrobacter DBTS2* (Sato y Clark, 1995).

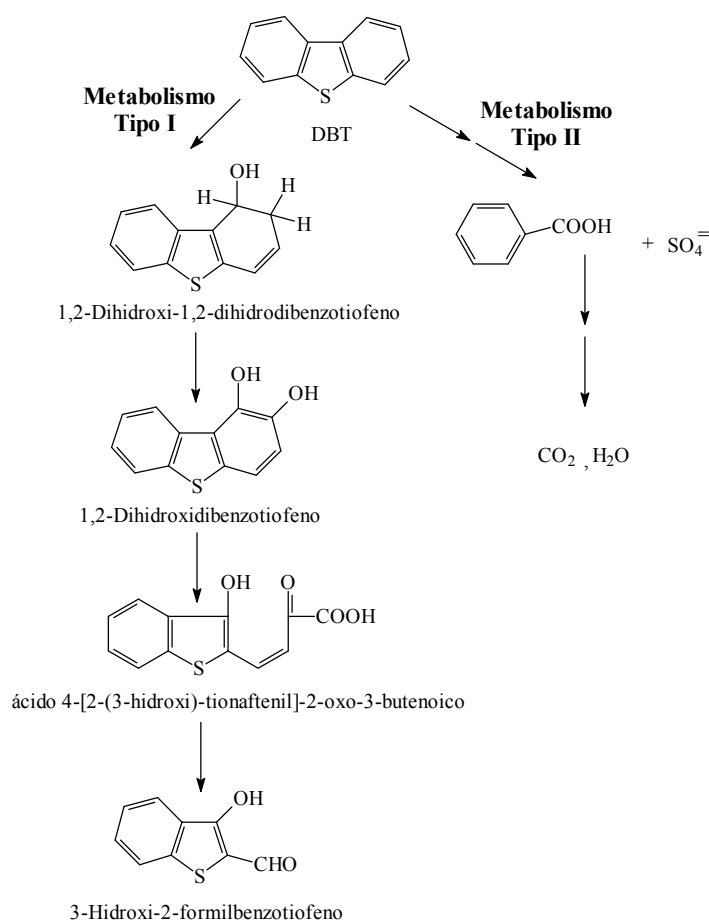


FIGURA 1.12 - Esquemas de las rutas anaerobias según metabolismos tipo I y II.

Finalmente, el metabolismo tipo III se produce en microorganismos que emplean las moléculas azufradas como fuente de azufre y no de carbono, de manera que se produce la ruptura selectiva del enlace carbono-azufre de los compuestos de partida, sin alterar su esqueleto carbonado. Se trata, por tanto, de rutas no destructivas en las que se lleva a cabo una verdadera desulfuración, porque se elimina el azufre presente en la molécula, afectando mínimamente a la estructura carbonada y manteniendo prácticamente intactas las propiedades del combustible tratado (Bhatia y Sharma, 2006) (Xu y col., 2006). Dentro de este tipo de metabolismo se encuentra la ruta 4S, que lleva a cabo *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gallagher y col., 1993), y que se describe a continuación.

- **La ruta 4S y sus enzimas**

Rhodococcus erythropolis IGTS8 es una bacteria de suelo Gram positiva capaz de utilizar el compuesto modelo DBT como fuente de azufre, pero no como fuente de carbono (Kilbane y Jackowski, 1992). La transformación de DBT en un compuesto libre de azufre, 2-hidroxibifenilo (HBP), pero que mantiene el esqueleto carbonado de partida, tiene lugar a través de un conjunto de cuatro reacciones en serie que constituyen la ruta 4S propuesta por Gallagher en 1993 (Gallagher y col., 1993). Los genes que codifican las enzimas que catalizan estas reacciones forman parte del operón *dsz* de 120 kb, inicialmente denominado *sox* (Denome y col., 1993 y 1994). Cada uno de los genes *dszA*, *dszB* y *dszC* codifica respectivamente las enzimas DszA, DszB y DszC, que participan en la ruta 4S como se muestra en la Figura 1.13 (Gray y col., 1996).

En 1995, se descubrió la necesidad de un aporte de poder reductor en forma de NADH, FMN o FAD para que la ruta 4S se lleve a cabo. La actividad de las enzimas DszA y DszC dependen de la oxidación de NADH y la oxidación de FMN, lo que hizo pensar en que debía existir una NADH:FMN oxidorreductasa, DszD, que regenerase el poder reductor para estas dos enzimas (Ohshiro y col., 1994 y 1995b). En *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se ha denominado a esta enzima NADH:FMN oxidorreductasa como “DszD”, que es una proteína de 20 kDa, que proporciona FMNH₂ a las enzimas DszA y DszC (Xi y col., 1997; Gray y col., 1996)

En 1997 se caracterizó la ruta 4S (Oldfield y col., 1997) mediante el estudio de los compuestos implicados (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP (Olson y col., 1993).

De acuerdo con lo anterior, las cuatro etapas de la ruta se describen a continuación y se representan en el esquema de la Figura 1.13.

i. La primera reacción de la ruta 4S está catalizada por la monooxigenasa DszC. Es una proteína tetramérica de 180 kDa (Gray y col., 1996). Esta reacción consiste en la oxidación de DBT dibenzotiofeno-5-óxido (DBT-sulfóxido o DBTO), invirtiendo, por cada molécula de DBT oxidada, un átomo de oxígeno, que se une al azufre del compuesto de partida, y liberando una molécula de H₂O y otra de FMN (Oldfield y col., 1997).

ii. En la segunda reacción, tiene lugar la oxidación de dibenzotiofeno-5-óxido hasta dibenzotiofeno-5,5-dióxido (DBT-sulfona o DBTO₂) por la acción de la misma enzima anterior, DszC. El consumo de oxígeno y de mononucleótido de flavina reducido y la producción de H₂O y FMN son análogos a los de la etapa anterior.

iii. La tercera reacción de esta ruta consiste en la apertura del anillo tiofénico por la adición de un tercer átomo de oxígeno. En este caso, la monooxigenasa DszA cataliza la transformación del DBTO₂ en 2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato (abreviado HBPS), con inversión de dos moléculas de FMNH₂ por cada molécula de DBTO₂. La enzima DszA es una proteína dimérica de 100 kDa (Gray y col., 1996 ,Ohshiro y col., 1999).

iv. Finalmente, en la última reacción, se libera una molécula de SO₃²⁻ y queda libre una molécula de 2-hidroxibifenilo (HBP) por cada molécula de DBT de partida. Esta última etapa está catalizada por la enzima desulfinasas DszB, una proteína monomérica de 40 kDa (Denome y col., 1994; Gray y col., 1996), que rompe el enlace C-S entre el grupo fenilo y el grupo ácido sulfinico (Oldfield y col., 1997).

La desulfuración de DBT tiene lugar a través de la ruta 4S en diversas bacterias del género *Rhodococcus* como *R. erythropolis* D1 (Izumi y col., 1994; Ohshiro y col., 1994), *Rhodococcus* ECRD1 (Grossman y col., 1999), *Rhodococcus* B1 (Denis-Larose, y col., 1997), *Rhodococcus* SY1 (Omori y col., 1992) y *Rhodococcus* UM3 (Purdy y col., 1993). También se conocen otros microorganismos mesófilos capaces de emplear la ruta 4S para desulfurar DBT, como por ejemplo *Sphingomonas* sp. (Darzins y Mrachko, 2000), *Gordonia* CYKS1 (Rhee y col., 1998), *Nocardia globerula* (Wang y Krawiec, 1994) y *Mycobacterium* sp. (Li y col., 2003).

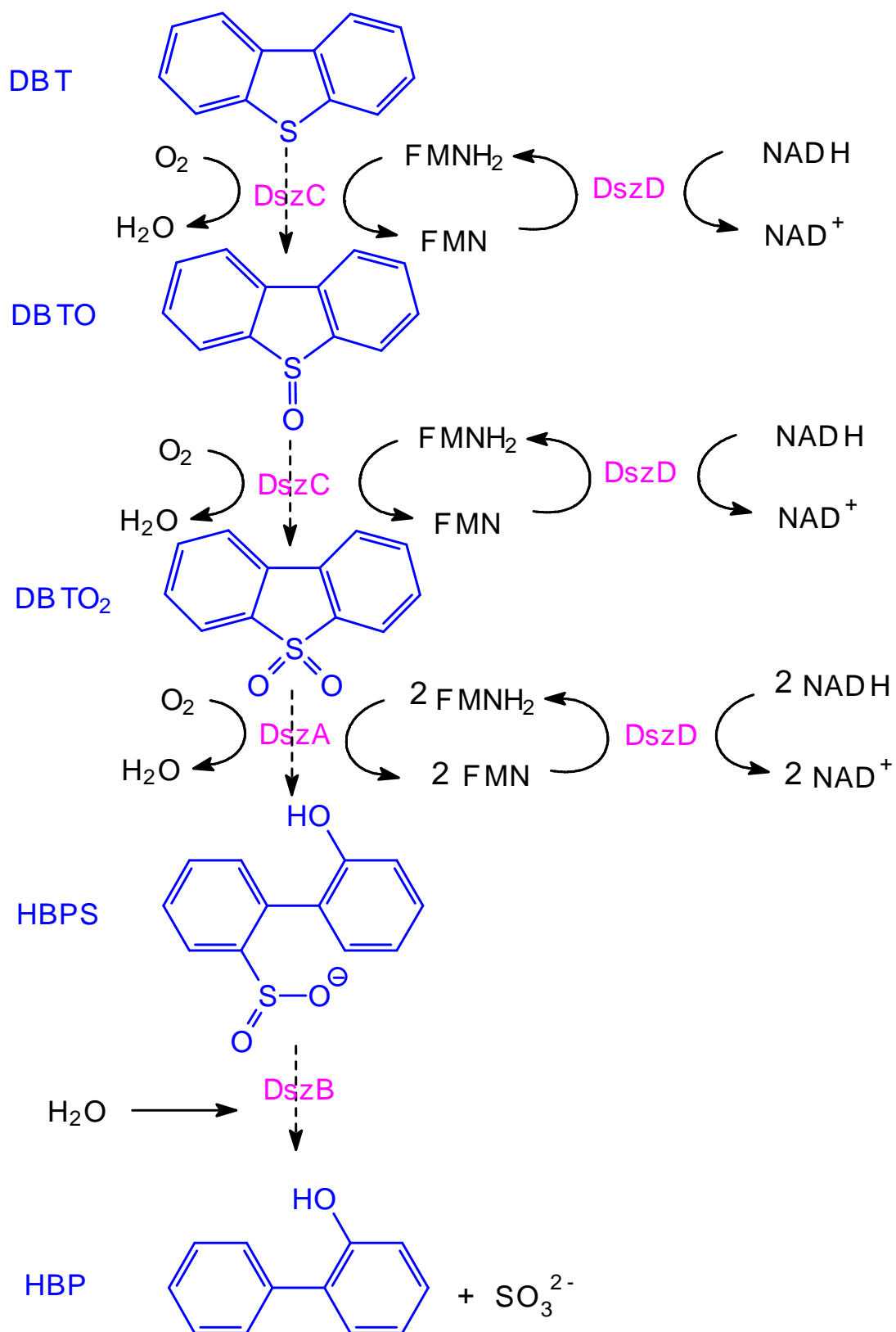


FIGURA 1.13 - Esquema de la ruta 4S llevada a cabo por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

1.3.1.1 Biocatalizadores para la BDS

La biodesulfuración surge ante el descubrimiento de microorganismos que presentan la capacidad de utilizar el azufre presente en diferentes compuestos que se encuentran en el petróleo (Kertesz, 1999). La revolución que supone el aislamiento de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y el conocimiento de la ruta 4S, no destructiva (Kilbane y Jackowski, 1992), ha desembocado en el estudio y desarrollo de un gran número de microorganismos para la eliminación del azufre mediante ésta y otras rutas selectivas no destructivas, como los que se recogen en las Tablas 1.4 y 1.5.

TABLA 1.4 - Algunos biocatalizadores empleados en la literatura para desulfurar (1ª parte).

Microorganismo	Referencia
<i>Agrobacterium</i> sp. MC501	(Constanti y col., 1994)
<i>Arthrobacter</i> sp. ECRD-1	(Lee y col., 1995)
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	(Labana y col., 2005)
<i>Bacillus subtilis</i> WU-S2B	(Kirimura y col., 2001)
<i>Corynebacterium</i> sp. ZD-1	(Wang y col., 2006)
<i>Gordona</i> sp. CYKS1	(Rhee y col., 1998)
<i>Gordona</i> sp. WQ-01	(Jia y col., 2006)
<i>Gordonia alkanivorans</i> RIPI90A	(Mohebbi y col., 2006)
<i>Gordonia alkanivorans</i> 1B	(Alves y col., 2005)
<i>Gordonia nitida</i> GYKS1	(Rhee y col., 1998)
<i>Gordonia</i> sp. F.5.25.8	(Duarte y col., 2001; Santos, y col., 2006)
<i>Gordonia</i> sp. strain ZD-7	(Li y col., 2006)
<i>Klebsiella</i> sp.	(Dudley y Frost, 1994)
<i>Mycobacterium goodii</i> X7B	(Li y col., 2007a)
<i>Mycobacterium phlei</i> GTIS10	(Kayser y col., 2002)
<i>Mycobacterium phlei</i> SM120-1	(Srinivasaraghavan y col., 2006)
<i>Mycobacterium</i> sp. G3	(Nekodzuka y col., 1997)
<i>Mycobacterium</i> sp. X7B	(Li y col., 2003)
<i>Mycobacterium</i> sp. ZD-19	(Chen y col., 2008)
<i>Nocardia globelula</i>	(Wang y Krawiec, 1994)
<i>Nocardia asteroides</i>	(Olson, 2000)

TABLA 1.5 - Algunos biocatalizadores empleados en la literatura para desulfurar (2ª parte).

Microorganismo	Referencia
<i>Paenibacillus</i> sp. A11-2	(Konishi y col., 1997)
<i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8	(Luo y col., 2003)
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279	(Alcón y col., 2005)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> D-1	(Izumi y col., 1994)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DR-1	(Li y col., 2007b)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> FSD-2	(Zhang y col., 2007)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> H-2	(Ohshiro y col., 1995a y b)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> I-19	(Folsom y col., 1999)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8	(Kilbane y Jackowski, 1992)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KA2-5-1	(Kobayashi, y col., 2000)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> LSSE8-1	(Xiong y col., 2007)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> NCC-1	(Li y col., 2007a)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> XP	(Yu y col., 2006)
<i>Rhodococcus</i> sp.	(Labana y col., 2005)
<i>Rhodococcus</i> sp. 1awq	(Ma y col., 2006a)
<i>Rhodococcus</i> sp. B1	(Denis-Larose y col., 1997)
<i>Rhodococcus</i> sp. DS-3	(Ma y col., 2006c)
<i>Rhodococcus</i> sp. ECRD-1	(Lee y col., 1995)
<i>Rhodococcus</i> sp. FMF	(Akbarzadeh y col., 2003)
<i>Rhodococcus</i> sp. IMP-S02	(Castorena y col., 2002)
<i>Rhodococcus</i> sp. P32C1	(Maghsoudi y col., 2000)
<i>Rhodococcus</i> sp. SY1	(Omori y col., 1992)
<i>Rhodococcus</i> sp. T09	(Matsui y col., 2001)
<i>Rhodococcus</i> sp. UM3	(Purdy y col., 1993)
<i>Rhodococcus</i> sp. UM9	(Purdy y col., 1993)
<i>Rhodococcus</i> sp. X309	(Denis-Larose y col., 1997)
<i>Sphingomonas</i> sp. AD109	(Darzins y Mrachko, 1998)
<i>Sphingomonas subarctica</i> T7b	(Gunam, y col., 2006)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	(Kardinahl y col., 1996)

La mayoría de los microorganismos que aparecen en la literatura son mesófilos. Entre ellos se encuentra *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Kilbane y Jackowski, 1992), *Rhodococcus erythropolis* H-2 (Gallagher y col., 1993), *Rhodococcus erythropolis* D-1 (Ohshiro y col., 1996), *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 (Ishii y col., 1998), *Rhodococcus* sp. ECRD-1 (Grossman y col., 1999 y 2001) y *Rhodococcus* sp. SY1 (Omori y col., 1992). Así como otros géneros diferentes de *Rhodococcus* como *Mycobacterium* sp. G3 (Okada y col., 2002) y *Gordona nitida* CYKS1 (Rhee y col., 1998).

También se han encontrado bacterias termófilas capaces de desulfurar compuestos azufrados presentes en el petróleo. El empleo de microorganismos que actúan a temperaturas elevadas permite algunas mejoras en el proceso de biodesulfuración en refinería (Mohebbi y Ball, 2008). En estas condiciones existen algunas ventajas desde el punto de vista tecnológico; la viscosidad del producto es menor, la transferencia de materia y la actividad de las enzimas están favorecidas, y se reduce el riesgo de contaminación microbiana (Gray y col., 2003), mientras que las condiciones de trabajo son más suaves que al emplear exclusivamente un proceso de HDS (Bhatia y Sharma, 2006). Entre los microorganismos termófilos empleados en la literatura como biocatalizadores para la BDS se encuentran los siguientes: *Paenibacillus* sp. A11-2 (Konishi y col., 1997; Onaka y col., 2001), *Sulfolobus acidocaldarius* (Kardinahl y col., 1996), *Bacillus subtilis* WU-S2B (Rhee y col., 1998), Kirimura y col., 2001) y *Mycobacterium phlei* (Furuya y col., 2001). También se ha desarrollado cepas recombinantes de *Thermus thermophilus* con genes que codifican enzimas de la ruta 4S procedentes de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Kayser, 2005)

Como se ha comentado previamente, el empleo de las herramientas de Ingeniería Genética ha permitido desarrollar microorganismos modificados genéticamente, a fin de obtener biocatalizadores con mejores características para llevar a cabo el proceso de BDS. La expresión de la oxidorreductasa procedente de *Vibrio harveyi* en *E. coli* logró mejorar la capacidad de desulfuración de esta bacteria (Reichmuth y col., 2000). Asimismo, se ha mejorado la actividad desulfurante mediante la aplicación de técnicas de Ingeniería Genética en *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 (Hirasawa y col., 2001). Otro ejemplo es la inserción de los genes dsz procedentes de *Rhodococcus erythropolis* DS-3 en *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para obtener bacterias recombinantes, no sólo de mayor actividad, sino con ausencia de inhibición por producto (Ma y col., 2006b).

Además de mejoras en bacterias del género *Rhodococcus* y en microorganismos termófilos, se ha propuesto el empleo de bacterias recombinantes del género *Pseudomonas* por su tolerancia a disolventes orgánicos para desulfurar compuestos modelo, como DBT (Le Borge y Quintero, 2003). El empleo de cepas de *Pseudomonas putida* y *P. aeruginosa* modificadas con los genes *dsz*, procedentes de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se ha realizado con éxito en la desulfuración de dicho compuesto modelo azufrado (Galán y col., 2000). En este sentido, se presentan en la literatura casos como el de *Pseudomonas putida* IFO 13696, modificada genéticamente con los genes *dsz* (Noda y col., 2003a), el de *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB9571, con la capacidad de desulfurar gasóleo ligero (Noda y col., 2003b), y el de *Pseudomonas putida* A4, con capacidad desulfurante en medios bifásicos (Tao y col., 2006).

El desarrollo de microorganismos modificados genéticamente para desulfurar se ha extendido a otros géneros como *Mycobacterium* (Watanabe y col., 2003a) y *Rhodococcus* (Watanabe y col., 2003b) y en *Bacillus subtilis* (Ma y col., 2006b).

El desarrollo de biocatalizadores más eficientes que permitan que la BDS sea aplicable a nivel industrial requiere del buen conocimiento de los microorganismos y de la mejora de sus características de cara al proceso. Muchos de los avances que se han producido en el desarrollo de mejores biocatalizadores se debe a la aplicación de las técnicas de Biología Molecular, en concreto la Ingeniería Genética y la Ingeniería Metabólica (Le Borge y Quintero, 2003).

La Ingeniería Genética busca la modificación controlada de la información genética de los microorganismos empleados, para aportarles nuevas o mejores capacidades (Le Borge y Quintero, 2003), pero también permite profundizar en el conocimiento de los biocatalizadores y la Ingeniería Metabólica para conocer el metabolismo, la genética y enzimología de la biodesulfuración (Suzuki, 1999). La aplicación de la tecnología del ADN recombinante ha permitido caracterizar los genes implicados en la biodesulfuración en *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y la expresión de dichos genes (Denome y col., 1994; Gray y col., 1996), para conocer mejor el funcionamiento de la ruta 4S (Ishii y col., 2000a). De esta manera, se ha podido estudiar el operón *sox*, también llamado *dsz*, así como las enzimas que codifican y que catalizan cada una de las reacciones de la ruta 4S (Oldfield y col., 1997). De forma análoga, se han clonado los genes implicados en la biodesulfuración en otros microorganismos termófilos, como *Paenibacillus* sp. A11-2 y *Bacillus subtilis* WU-S2B (Furuya y col.,

2004) para estudiar las rutas metabólicas que emplean estos microorganismos en la BDS.

A partir de aquí, estas herramientas permiten desarrollar microorganismos modificados genéticamente para obtener biocatalizadores que transformen el mayor número posible de compuestos azufrados presentes en el petróleo, que posean mayor actividad para dar eficiencia y viabilidad económica al proceso, que sean estables bajo las condiciones de operación del mismo y, en algunos casos, que presenten una excreción controlada de surfactantes que actúen como coadyuvantes en la desulfuración (McFarland, 1999; Le Borge y Quintero, 2003).

La Genómica y la Proteómica son herramientas muy útiles en la mejora de los microorganismos empleados en la desulfuración (Bhatia y Sharma, 2006). Un ejemplo es el aumento en la actividad desulfurante de *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 mediante la aplicación de Ingeniería Genética (Hirasawa y col., 2001). Se estima que para obtener biocatalizadores viables comercialmente, se debe aumentar la actividad de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 alrededor de 200 veces (Pacheco, y col., 1999). Por este motivo, en la literatura se presentan numerosos trabajos en los que se modifica esta bacteria para obtener mejoras (Larkin y col., 1998), sobre todo para aumentar el conjunto de sustratos azufrados sobre los que puede actuar (Folsom y col., 1999). El proceso de BDS necesita de las técnicas de modificación genética, la tecnología de ADN recombinante, coexpresión, sobreexpresión y clonación de genes para mejorar el proceso desde el biocatalizador (Bhatia y Sharma, 2006).

La Ingeniería de Proteínas es otro campo de gran aplicación en el desarrollo de biocatalizadores para la desulfuración de combustibles fósiles, aplicando metodologías de la tecnología del ADN recombinante, PCR, para amplificar fragmentos de ADN in vitro, y diversas herramientas de bioinformática. Mediante la manipulación directa de los genes microbianos, se pueden obtener proteínas, especialmente enzimas, diseñadas para ser solubles en medios orgánicos, para permitir el acceso de determinadas moléculas azufradas a sus centros activos, para ser activas frente a varios sustratos y que posean la estabilidad adecuada para las condiciones de un proceso económicamente viable (Le Borge y Quintero, 2003).

1.3.1.2 Desarrollo de un proceso de BDS

La tecnología de BDS presenta una serie de ventajas que la hicieron muy atractiva en los años 90. Se planteaba como un proceso potencialmente sencillo de aplicar a las fracciones petrolíferas, con la posibilidad de recuperar y reutilizar el biocatalizador con facilidad (Shong, 1999). El descubrimiento de microorganismos con rutas metabólicas que eliminan selectivamente el azufre, sin afectar al resto de las estructuras carbonadas (Kilbane, 1990 y Denome y col., 1994), pronosticaba un futuro muy prometedor a esta tecnología que minimizaría las pérdidas de calidad en el combustible tras un tratamiento de desulfuración. La aplicación de la Ingeniería Genética ha permitido y permite el desarrollo de cepas recombinantes capaces de desulfurar un mayor abanico de compuestos azufrados. Las capacidades mejoradas de los microorganismos desulfurantes hacen, así, que los procesos sean más eficaces, con menores inversiones energéticas, emisiones de gases de efecto invernadero y costes económicos (Shong, 1999).

Sin embargo, aunque se han logrado muchos avances en el conocimiento bioquímico y microbiológico de la BDS, aún no se logrado desarrollar un proceso comercial de desulfuración biológica (Kilbane, 2006).

Actualmente, se presenta una serie de retos a los que la BDS debe hacer frente para llegar a ser un proceso viable a nivel industrial. Algunos de ellos se han comentado previamente, y están relacionados con la mejora de las características de los biocatalizadores, el desarrollo de operaciones de separación que permitan la recuperación del combustible tratado y la reutilización de las células, el tratamiento de las mayores relaciones posibles entre fases orgánica y acuosa, la obtención de subproductos de valor comercial, el diseño de los reactores biológicos y la optimización de las condiciones de operación (Setti y col., 1997).

Respecto a los biocatalizadores, es necesario aumentar su actividad del orden de 200 veces con respecto de la de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, según la literatura (Pacheco, y col., 1999) para llegar a valores comercialmente competitivos (Setti y col., 1997; Le Borge y Quintero, 2003; Van Hamme y col., 2003), Gupta y col., 2005; Soleimani y col., 2007). Asimismo es necesario que los biocatalizadores presenten una estabilidad adecuada frente a las condiciones de operación y una tolerancia elevada a la fase orgánica en tratamiento (Setti y col., 1997; Le Borge y Quintero, 2003; Van

Hamme y col., 2003; Gupta y col., 2005; Xu y col., 2006; Soleimani y col., 2007). Por otro lado, se busca que los microorganismos tengan una cierta especificidad (Setti y col., 1997; Gupta y col., 2005), que permita, al mismo tiempo, tratar la mayor cantidad de compuestos azufrados posible, una vida operativa entre las 200 y 400 h y posibilidad de ser reutilizados y regenerados (McFarland, 1999; Pacheco, y col., 1999), Le Borge y Quintero, 2003; Xu y col., 2006).

Uno de los aspectos que merece gran atención en el diseño de un proceso de BDS es el desarrollo de operaciones de separación para recuperar la fase orgánica tratada y el biocatalizador empleado. En el caso particular de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, la capacidad de excreción de biosurfactantes da lugar a emulsiones muy estables, que dificultan considerablemente la separación de las fases orgánica y acuosa (Pacheco, y col., 1999; Borole y col., 2002). En la literatura se ha propuesto el uso de hidrociclones para recuperar las diferentes fases tras el tratamiento (Yu y col., 1998).

El desarrollo de procesos más eficientes implica el empleo de una elevada relación de la fase orgánica tratada sobre la fase acuosa (necesaria incluso en una pequeña proporción para la actividad microbiana (Van Hamme y col., 2003) para así reducir el volumen necesario del reactor y optimizar la eficiencia del proceso (Pacheco y col., 1999; Xu y col., 2006).

Otro de los aspectos que se han propuesto para mejorar la viabilidad del proceso de BDS es la recuperación de subproductos con salida en el mercado. Se ha propuesto en algunos casos truncar la ruta 4S para producir sulfonas y sulfinatos que pueden utilizarse como surfactantes (Monticello, 2000; Kilbane, 2006) También se ha propuesto el empleo del compuesto final de la ruta 4S, hidroxibifenil, como biocida (Monticello 2000), o para producir otros productos de interés como resinas fenólicas o adhesivos (Pacheco, y col., 1999).

- **Formas de operación**

En la literatura se han presentado diferentes configuraciones para llevar a cabo la desulfuración biológica. En una futura aplicación industrial se pueden considerar las posibilidades que se describen a continuación.

Una posibilidad consiste en el empleo de enzimas libres como biocatalizador. En este caso se utilizan extractos celulares en vez de células completas, de manera que se evitan problemas de difusión de reactivos y productos a través de la membrana. Aunque

estos sistemas son complicados de mantener a nivel industrial y requieren costes derivados del mantenimiento de las condiciones de operación, se han utilizado sistemas de este tipo para la desulfuración de compuestos modelo en la literatura (Ohshiro y col., 1994). Sin embargo, la actividad de estos extractos celulares es menor que la que presentan las células enteras, que poseen mecanismos para regenerar los cofactores y el poder reductor que necesitan las enzimas (Setti y col., 1997; Soleimani y col., 2007), y cuyo aporte externo es complicado y costoso de mantener por la inestabilidad de estos compuestos. Es más, la extracción y purificación de estas enzimas es un proceso caro que puede hacer económicamente inviable el proceso (Setti y col., 1997).

El empleo de células microbianas enteras como biocatalizador, parece mucho más ventajoso que el caso anterior. Utilizar células que mantienen la integridad de su membrana y su organización interna permite guardar las condiciones óptimas a las que trabajan sus enzimas, sin necesidad de aportar determinados compuestos muy lábiles (cofactores, coenzimas, entre otros). Los problemas que podrían surgir al emplear células enteras a causa de una interacción entre diferentes sistemas enzimáticos del microorganismo, pueden evitarse llevando a cabo la mutación celular, las represión de las actividades enzimáticas o desnaturalizando las proteínas no deseadas (Setti y col., 1997). En la Figura 1.14 se compara, de manera esquematizada, el empleo de biocatalizadores como células enteras y como extractos enzimáticos.

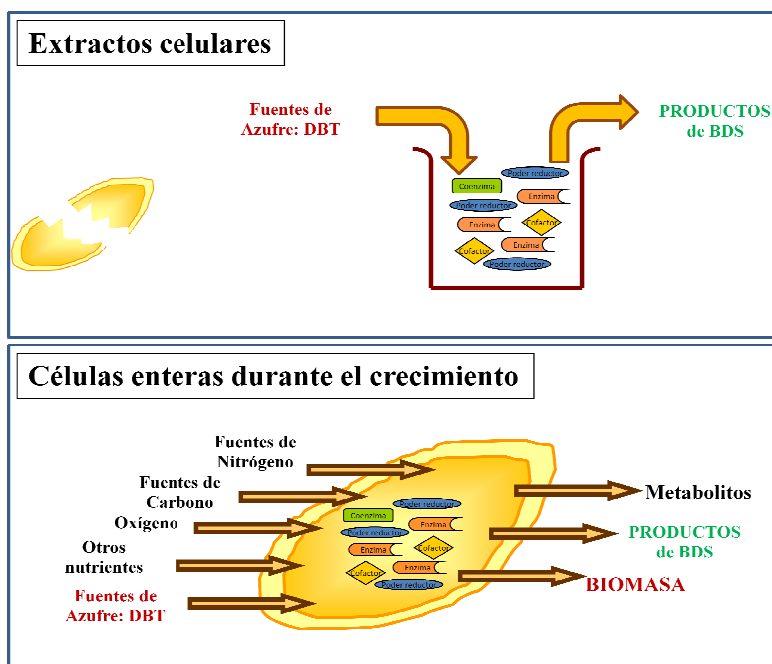


FIGURA 1.14 - Representación esquemática de la desulfuración con extractos celulares y con células enteras.

Las formas de operación para células enteras en biodesulfuración se pueden clasificar según dos criterios: la presencia o no de un soporte que retenga las células, y las condiciones que permitan o impidan la duplicación de las células.

En el primer caso, se puede considerar la operación empleando células libres (en emulsión, en suspensión homogénea) o bien, inmovilizadas en soportes o retenidas en matrices. El empleo de sistemas de inmovilización o de atrapamiento permite operaciones en continuo, así como la recuperación y reutilización del biocatalizador. Aventaja a la operación con células libres, en la mayor estabilidad y actividad que presenta el catalizador, en una mejor tolerancia a compuestos orgánicos (lo que permite trabajar con mayores relaciones entre la fase orgánica y la acuosa), y en una disminución del riesgo a la contaminación con otros microorganismos (Setti y col., 1997).

En el segundo caso, se puede considerar llevar a cabo la BDS empleando células en crecimiento o en reposo (*resting cells*). En condiciones de crecimiento, el biocatalizador dispone de los recursos necesarios en el medio, tanto para desulfurar como para multiplicarse y mantenerse vivo. En condiciones de reposo, se trabaja con células que han desarrollado su capacidad desulfurante hasta una edad celular, pero cuya reproducción se detiene mediante la eliminación de los nutrientes que permitan su duplicación. En condiciones de *resting cells*, las células actúan como meros contenedores y protectores de las enzimas y cofactores, y mantienen en su interior la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la BDS. Esta forma de operar es la que predomina en el diseño de procesos para la biodesulfuración de crudo, y de sus fracciones, siendo siempre necesario un crecimiento y preparación previos de las células con capacidad desulfurante.

Muchos autores han reflejado en la literatura la ventajas de biodesulfurar durante el crecimiento, sobre todo por poder mantener la actividad de las células de forma más prolongada (Soleimani y col., 2007; Yang y col., 2007). Sin embargo, las operaciones en crecimiento presentan como inconvenientes la menor velocidad del proceso y los menores rendimientos que se consiguen (Soleimani y col., 2007), así como la posible inhibición del biocatalizador causada por el producto final de la ruta (Nekodzuka y col., 1997). Por estos motivos, y por las dificultades que presentan muchos microorganismos para crecer en sistemas bifásicos, otros autores eligen trabajar en condiciones de *resting cells* (Soleimani y col., 2007). La separación entre crecimiento y desulfuración permite

operar de manera más eficiente (Ohshiro y col., 1996), sobre todo por ser una operación sencilla y por evitar interferentes y la presencia de subproductos (Konishi y col., 1997). Fundamentalmente, la posibilidad de trabajar con grandes concentraciones de biomasa es una ventaja puesta de manifiesto por muchos investigadores en la bibliografía (Le Borge y Quintero, 2003).

- **BDS complementaria a la HDS**

En la actualidad, la BDS no se plantea como un proceso completamente alternativo a la HDS, a causa del limitado avance que ha tenido su desarrollo como proceso a nivel comercial, debido a las limitaciones que deben superarse, comentadas previamente (Setti y col., 1997; Kilbane, 2006). Más bien, se plantea la posibilidad de constituir un proceso complementario a la HDS (Grossman y col., 2001) que permita reducir las severas condiciones de operación de hidrogenación, y así, disminuir los costes económicos, energéticos, las emisiones y la pérdida de valor calorífico en el producto tratado. Esta complementariedad se justifica por el hecho de que los compuestos que son estables y más resistentes a la HDS son más fácilmente tratables mediante desulfuración biológica (Kilbane, 2006).

Existen diferentes opiniones sobre la posición relativa de la BDS con respecto de la HDS en un proceso complementario. Algunos autores consideran que la biodesulfuración debería ser una etapa posterior a la hidrodeshulfuración, que opere sobre los compuestos más difíciles de transformar por el hidrotratamiento (Monticello, 2000). En otros trabajos se aboga por que la primera etapa sea la BDS, para reducir las necesidades de enfriar la corriente de entrada, suavizar condiciones de operación en la posterior HDS y, por tanto, el gasto en hidrógeno, siempre cumpliendo con exigencias legales y la calidad final del producto.

1.4 *Pseudomonas putida* CECT5279

Para llevar a cabo este trabajo, ha sido necesario el desarrollo de *Pseudomonas putida* CECT5279, un microorganismo modificado genéticamente, capaz de expresar los genes que codifican las enzimas de la ruta 4S para desulfurar DBT. Este microorganismo porta el operón *dszABC* procedente de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, en el plásmido pESOX4, y el gen *hpaC* de *Escherichia coli* W integrado en el cromosoma bacteriano. El operón *dszABC* codifica las respectivas enzimas DszA, DszB y DszC de la ruta 4S, y el gen *hpaC* codifica la NADH:FMN oxidorreductasa HpaC, que aporta el poder reductor que necesitan las enzimas DszA y DszC.

El equipo del Dr. José Luis García López, en el Departamento de Microbiología Molecular en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) ha desarrollado este microorganismo recombinante, capaz de expresar los genes de las enzimas de la ruta 4S y desulfurar DBT. Se escogió el género *Pseudomonas* por ser muy abundante en el petróleo y estar muy estudiadas, además de presentar gran tolerancia a disolventes orgánicos y metales pesados presentes en los combustibles fósiles.

Los genes *dsz* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se introdujeron en *E. coli* para construir un *cassette* recombinante de los genes *dsz*. Se logró eliminar la represión de la ruta por presencia de compuestos azufrados, mediante el control de un promotor heterólogo. Se obtuvo un fragmento de 3,8 kb del plásmido PSAD225-32 utilizando las endonucleasas de restricción DraI y SnaBI. Se trata de un fragmento sin promotor ni regiones reguladoras asociadas, que se clonó bajo el control del promotor *lac* de *E. coli* en el vector pUC18 digerido mediante la endonucleasa de restricción HincII, bajo el promotor Plac de *E. coli*. De esa manera, se obtuvo el plásmido pESOX1. Se comprobó la capacidad para desulfurar DTB de las células de *E. coli* modificadas con este plásmido (Gallardo y col., 1997).

El plásmido pESOX1 se cortó con el par de endonucleasas EcoRI y HindIII y se clonó en el plásmido PVL31 bajo el control del promotor *Ptac*. El resultado, es el plásmido pESOX3, que aporta la capacidad de desulfurar DBT en células de *E. coli* JM109 bajo la inducción de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Este plásmido

pESOX3 contiene un fragmento llamado DNARP4, que permite su movilización, transferencia a otras cepas receptoras.

Para evitar las pérdidas del plásmido que contiene el operón *dsz*, se consiguió construir un plásmido pESOX4 a partir del pESOX3, un transposón mini-Tn5, y un gen de resistencia a la tetraciclina.

Pseudomonas putida CECT5279, con estas características, presenta mayor eficacia que *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, porque la expresión de los genes está controlada por un promotor (*P_{tac}*) más fuerte que en el caso de *Rhodococcus*, inducible mediante IPTG, de tal forma, que en presencia de IPTG, se permite la transcripción de los genes de la ruta 4S (Gallardo y col., 1997).

Este microorganismo se ha empleado como biocatalizador en la desulfuración de DBT en diferentes estudios previos, tanto en fase acuosa (Martín, 2005), como en sistemas bifásicos (Caro, 2006).

A raíz del estudio de la influencia de la composición del medio y de las condiciones de operación en la capacidad desulfurante de este microorganismo durante su crecimiento, se ha desarrollado un protocolo estandarizado para la obtención de este biocatalizador, buscando la mayor desulfuración y producción de biomasa posibles (Martín y col., 2004 y 2005). Esto ha permitido el desarrollo de un modelo que describe de forma paralela a la producción de biomasa, el desarrollo de la capacidad desulfurante de este microorganismo en condiciones de *resting cells*. Por otro lado, se ha evaluado la influencia de la transferencia de oxígeno tanto en el crecimiento de esta bacteria, como en desarrollo de su capacidad para llevar a cabo la ruta 4S (Gómez y col., 2006), y se ha estudiado la influencia de las condiciones de operación en la velocidad inicial de cada una de las reacciones de la ruta 4S (Santos y col., 2007).

Se han obtenido buenos resultados en la BDS de DBT en condiciones de *resting cells* con *Pseudomonas putida* CECT5279 (Martín, 2005 y Caro y col., 2007a) y se ha desarrollado un modelo cinético para describir la evolución de los compuestos de la ruta 4S en estas condiciones empleando células de diferentes tiempos de crecimiento (Alcón y col., 2008). Asimismo, se ha empleado también este microorganismo de desulfuración durante su crecimiento (Caro, 2006; Caro y col., 2008a y 2008b).

1.5 Objeto y alcance del trabajo

En la presente Tesis Doctoral se aborda la desulfuración de dibenzotiofeno (DBT), empleado como compuesto modelo en fase acuosa, bajo la acción catalítica de células de un microorganismo modificado genéticamente, *Pseudomonas putida* CECT5279, según diferentes formas de operación que se proponen.

Las actuales necesidades energéticas de la población, unidas a una alta dependencia de los combustibles fósiles, explican la emisión de importantes cantidades de óxidos de azufre a la atmósfera. A causa de los conocidos efectos nocivos de estos óxidos sobre la salud de las personas, la integridad de diferentes ecosistemas y la estabilidad de diferentes materiales, se han desarrollado varias tecnologías para evitar, en origen, la emisión de estos compuestos. Entre estas tecnologías, la más utilizada, en el caso de los combustibles derivados del petróleo, es la hidrodesulfuración (HDS). Aunque esta técnica es eficaz en la eliminación de compuestos azufrados, la necesidad de desarrollar reactores y catalizadores más eficientes, así como las intensas condiciones de operación que se requieren para cumplir la legislación vigente (en lo que se refiere a presión y temperatura), dan lugar a una inversión económica elevada, a considerables emisiones de CO₂, y también a posibles pérdidas en la calidad del producto final.

En este trabajo se plantea el empleo de un sistema biológico de desulfuración como una etapa complementaria a un tratamiento de HDS moderado, que permitiría un elevado rendimiento en la eliminación de los compuestos azufrados presentes en las fracciones petrolíferas ligeras, con una inversión energética aceptable y la mínima afección a las propiedades finales del combustible.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, el empleo de *Pseudomonas putida* CECT5279 en la biodesulfuración de DBT, seguirá procedimientos estandarizados, desarrollados en trabajos previos del grupo de investigación FQPIMA, cuyo objetivo es, por un lado, la conservación y obtención de células de capacidad desulfurante repetitiva y, por otro lado, la realización de ensayos normalizados para la evaluación de dicha capacidad. Asimismo, se hará necesario el desarrollo de métodos de medida de la actividad de las enzimas implicadas en la ruta 4S, a través de la cual se produce la transformación de DBT en un compuesto libre de azufre, HBP. Por otro lado, se desarrollará un método de determinación de la cantidad de enzima DszB producida a lo largo de la edad celular, que cataliza la etapa controlante de dicha ruta 4S. Además, se

intentará mejorar el método de análisis de los compuestos de esta ruta metabólica, para realizar el seguimiento de los cinco compuestos principales implicados en la transformación de DBT en HBP, mediante una única etapa de análisis.

Los resultados obtenidos mediante la evaluación de las actividades enzimáticas a lo largo de la edad celular, mediante el método comentado previamente, serán determinantes a la hora de conocer el comportamiento de las células de este microorganismo en cada una de las etapas de la ruta 4S. La evolución de las actividades de las enzimas DszA, DszB y DszC a lo largo del tiempo de crecimiento permitirá seleccionar edades celulares de *Pseudomonas putida* CECT5279 por su eficiencia para catalizar la ruta 4S o determinadas etapas de la misma.

De esta manera, se propondrán diferentes formas de operación para la eliminación del azufre presente en la molécula de DBT empleando, bien células de *Pseudomonas putida* CECT5279 durante su crecimiento, bien células en condiciones de reposo celular, sin posibilidad de duplicación, de determinadas edades seleccionadas a raíz del estudio previo de actividad de las enzimas implicadas en la mencionada ruta 4S. También, se diseñarán y desarrollarán experimentos de desulfuración basados en la combinación de células de diferentes edades características, bien de manera secuencial, bien de forma simultánea, para llevar a cabo la desulfuración de DBT en condiciones de *resting cells*.

Para las diferentes formas de operación propuestas, se definirán criterios de comparación, expresados como parámetros objetivos y medibles, relacionados con la capacidad de eliminación del sustrato de partida, la capacidad y eficiencia de producción del compuesto final de la ruta 4S, HBP, y la concentración de células empleada. Se buscará como objetivo la mayor conversión de DBT en HBP, en el menor tiempo posible y con la menor inversión de biomasa.

Una vez evaluadas las diferentes formas de operación propuestas, se abordará el desarrollo de un modelo cinético que describa la evolución de los cinco compuestos principales implicados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) en la desulfuración de DBT, al emplear, en condiciones de *resting cells*, células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de tiempos de crecimiento característicos según el perfil obtenido de actividad enzimática de cada una de las enzimas involucradas. Finalmente, se propondrá la simulación, mediante el modelo cinético que se obtenga, de los datos obtenidos en experimentos de desulfuración en que se combinen diferentes

edades celulares de este microorganismo. Se pretende formular un modelo que describa la desulfuración de DBT al utilizar como biocatalizador células de este microorganismo de edades celulares seleccionadas, y que, asimismo, sea capaz de predecir aceptablemente el comportamiento de biocatalizadores compuestos, formulados con células de diferentes tiempos de crecimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del trabajo descrito en esta Memoria ha sido necesario desarrollar y utilizar diferentes técnicas analíticas y experimentales que se describirán a lo largo del presente capítulo. Asimismo, se recopilan las características de los equipos empleados, los materiales que se han utilizado y una descripción del microorganismo objeto de este estudio.

2.1 Materiales

A continuación, se detallan los aspectos relacionados con el microorganismo empleado, los reactivos, equipos y medios de crecimiento utilizados durante la fase experimental para su cultivo, manipulación, y la evaluación de su actividad desulfurante.

2.1.1 EL MICROORGANISMO

Pseudomonas putida CECT5279 es el microorganismo empleado para la realización de este estudio. Se trata de un organismo modificado genéticamente y desarrollado por el equipo del Dr. José Luis García López, en el Departamento de Microbiología Molecular en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) (Galán y col., 2000). En la Figura 2.1 aparece una fotografía de su crecimiento en placa.

El género *Pseudomonas* pertenece al orden *Pseudomonadales*, se encuentra dentro de la familia *Pseudomonadaceae* según la actual clasificación taxonómica (Brenner y col., 2005).

- Reino: *Bacteria*
- Filo: *Proteobacteria*
- Clase: *Gammaproteobacteria*
- Orden: *Pseudomonadales*
- Familia: *Pseudomonadaceae*
- Género: *Pseudomonas*

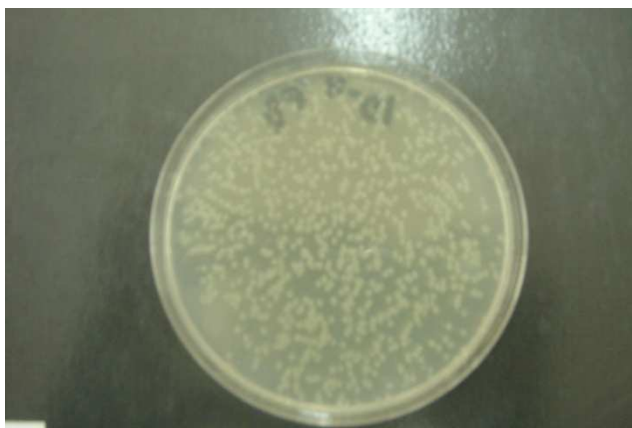


FIGURA 2.1- Fotografía de *Pseudomonas putida* CECT5279 crecida en una placa *Petri* con agar

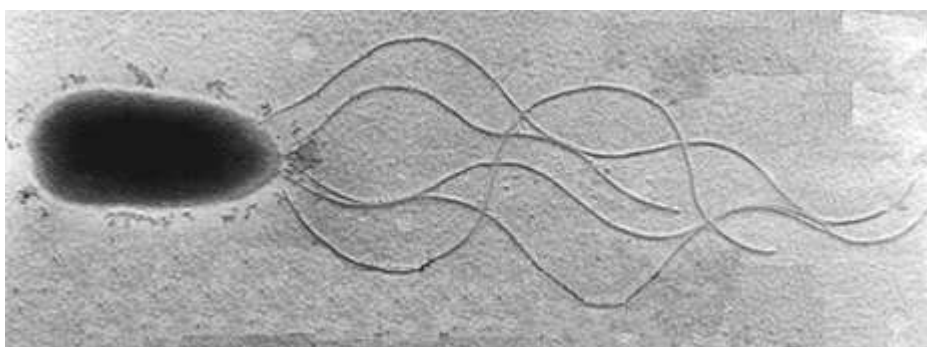


FIGURA 2.2 - Micrografía electrónica de transmisión de *Pseudomonas putida*.

Se trata de un bacilo Gram negativo, recto o ligeramente curvado, dotado de uno o varios flagelos polares, como se puede apreciar en la Figura 2.2. Es una bacteria quimioheterótrofa, aerobia estricta y catalasa positiva. No forma esporas ni fermenta azúcares (Palleroni y Doudoroff, 1972; Brenner y col., 2005). La forma natural de *Pseudomonas putida* es muy abundante en la naturaleza. Tiene gran importancia en la degradación aerobia de la materia orgánica y es capaz de habitar zonas afectadas por vertidos, así como degradar compuestos antropogénicos y recalcitrantes.

Pseudomonas putida CECT5279, es una bacteria recombinante en la que se ha incluido el operón *dszABC* de otro microorganismo con capacidad desulfurante natural, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Se obtuvo transformando *P. putida* KTH2 (Prieto y col., 1996) con el plásmido pESOX3 (Gallardo y col., 1997). La cepa KTH2 procede de *P. putida* KT2442 (de Lorenzo y Timmis, 1994) y porta el gen que codifica la reductasa HpaC dependiente de FMN:NADH procedente de *Escherichia coli* W (Galán y col., 2000) insertada en su cromosoma. Esta enzima proporciona el FMNH₂ necesario para las tres primeras reacciones de la ruta 4S, catalizadas por las enzimas DszA y DszC. El plásmido pESOX3 procede de la modificación del vector pVLT31, que es un plásmido

de amplio espectro de huésped con resistencia a la tetraciclina. El plásmido pESOX3 permite expresar los genes *dszABC* bajo el control de un promotor *Ptac* (Gallardo y col., 1997). Estos genes codifican, respectivamente, las enzimas DszA, DszB y DszC de la ruta 4S, cuya explicación se abordó en el apartado 1.3.1 de la presente Memoria.

Se trata de un microorganismo modificado genéticamente para expresar, en presencia de un inductor (en este caso IPTG) los genes que codifican la ruta 4S para desulfurar DBT como compuesto modelo. En el plásmido en el que se encuentra esta información, existe un gen de resistencia a la tetraciclina que evita la pérdida del operón *dszABC* en las sucesivas generaciones del microorganismo.

2.1.2 REACTIVOS

A continuación, se enumeran los reactivos empleados durante la experimentación en este trabajo. En la Tabla 2.1 aparecen los reactivos empleados para la medida del poder desulfurante en los ensayos de *resting cells*, y su análisis mediante HPLC, que se describirán más adelante. En la Tabla 2.2 se muestran los compuestos químicos utilizados para la formulación de los medios de cultivo necesarios para la conservación, mantenimiento y crecimiento del biocatalizador. Más adelante, se muestran también los productos químicos empleados para el análisis del contenido proteico total celular, en la Tabla 2.3, y para la detección de la proteína DszB mediante electroforesis e inmunotransferencia Western-Blot, en la Tabla 2.4.

TABLA 2.1 - Reactivos para la medida del poder desulfurante en los ensayos de *resting cells*.

Compuesto	Marca	Pureza	Código
HEPES (N-2-Hidroxietil)-piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico)	Panreac	99%	375229
Dibenzotiofeno (DBT)	ALDRICH	99%	34,783-3
Dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO)	Sintetizado por el Grupo de Investigación		
Dibenzotiofeno-5,5-dióxido (DBTO ₂)	ALDRICH	97%	D3,240-7
2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfonato (HBPS)	Sintetizado por el Grupo de Investigación		
2-Hidroxibifenilo (HBP)	ALDRICH	99%	P2, 826-3
Acetonitrilo	SDS	> 99,9%	0063721

TABLA 2.2 - Reactivos para los medios de cultivo.

Compuesto	Marca	Pureza	Código
Agar-agar	Panreac	-	141792
Tryptona	FLUKA	-	70194
Extracto de levadura	FLUKA	-	70171
Cloruro sódico	Panreac	99.5%	121659
Tetraciclina	FLUKA	95%	T- 3258
Fosfato sódico monobásico monohidratado	CALBIOCHEM	98,8%	567549
Hidrogenofosfato de potasio anhidro	Panreac	99%	121512
Cloruro de amonio	Panreac	>99,5%	141121
Cloruro de magnesio hexahidratado	Probus	95%	120410
Cloruro cálcico dihidratado	Riedel de Haën	95%	12018
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	RIEDEL-DE HAËN	99%	31232
Glicerol	PANREAC	Puro	211339
2-propanol	PANREAC	99,8%	131090
Ácido L-glutámico	PANREAC	98.5%	142042
IPTG (Isopropil-β- D-tiogalactopiranosido)	SIGMA	Puro	1- 6758
Sulfato de magnesio heptahidratado	PROBUS	Puro	121310
Hidróxido sódico	RIEDEL-DE HAËN	99%	30620
Ácido clorhídrico	Panreac	37%	131013
Silicona líquida antiespumante	Panreac	-	211628

TABLA 2.3 - Reactivos para la medida de proteína celular total

Compuesto	Marca	Pureza	Código
Reactivo de Bradford para 1-1,400 µg/mL de proteína	SIGMA	-	B6916
Albúmina de suero bovino	SIGMA	-	A1933

TABLA 2.4 - Reactivos para el procedimiento Western Blot anti-DszB

Compuesto	Marca	Pureza	Código
Proteína KLH	SIGMA	-	H7017
Disolución al 40% de acrilamida:bisacrilamida	BIO-RAD Laboratories	-	161-0148
TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamida)	Aldrich	99%	T22500
SDS (dodecilsulfato de sodio)	BIO-RAD Laboratories	-	161-0301
Persulfato amónico	SIGMA	>98%	A3678
Reactivo de Bradford	BIO-RAD Laboratories	-	500-0006
Dihidrógenofosfato de sodio monohidrato	MERK	>99%	106346
Hidrogenofosfato de disodio	MERK	>99%	106586
Glicerina	MERK	87%	104094
Membrana de nitrocelulosa	BIO-RAD Laboratories	-	162-0115
DTT (ditiotreitól)	BIO-RAD Laboratories	-	161-0611
Tritiplex [®] III Na ₂ EDTA	MERK	-	108446
Tris-[hidroximetil]-aminometano)	MP Biochemicals LLC	99.9%	819623
Glicina	MERK	98.5%	500190
Metanol	MERK	99.5%	822283
Albúmina de suero bobino	SIGMA	-	A1933
Tween [®] 20	SIGMA	-	P1379
Anticuerpo secundario <i>anti-rabbit</i>	Amersham Pharmacia Biotech	-	-
Kit ECL para detección por transferencia Western	Amersham Pharmacia Biotech	-	RPM2106

2.1.2.1 Síntesis de reactivos no comerciales

Entre los compuestos que forman parte de la ruta 4S, se encuentran DBTO y HBPS; ninguno de los dos disponibles comercialmente. Por este motivo ha sido necesaria su síntesis. El Dr. Pedro Yustos Cuesta, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid, amablemente preparó ambos compuestos siguiendo los protocolos que se detallan a continuación.

- **Dibenzotiofeno sufóxido: DBTO**

Se disuelven 5 g de DBT (27,17 mmoles) en 60 mL de metanol. Esta disolución se introduce en un matraz de tres bocas equipado con un condensador de reflujo, un embudo de goteo y tubos de entrada y salida de nitrógeno. Este matraz se mantiene a 64 °C en un baño de cloroformo/nitrógeno líquido. Se adicionan 3g de hipoclorito de t-butilo (27,65 mmoles). El hipoclorito de t-butilo se prepara por reacción del alcohol t-butílico a 0 °C con 1 equivalente de una disolución comercial de hipoclorito de sodio y 1 equivalente de ácido acético. Tras esto, se separa y se seca sobre sulfato sódico, obteniendo un aceite amarillo, con $B_p = 77-78^\circ / 760 \text{ mmHg}$; esta mezcla se agita durante 30 minutos. Después, se añade carbonato de sodio anhidro (3g, preparado por secado a 210 °C durante 12 horas) y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente, con agitación. La disolución se filtra y se elimina el metanol en un rotavapor. El sólido blanco obtenido (5,16 g, rendimiento.: 95%) se recrystaliza con metanol. Este producto se analiza por GC/MS (HP6890 GC-MS, detector MSD 5973), para lo cual se utiliza una columna HP-INNOWAX (Crosslinked PEG) 30 m x 0,25 mm con partículas de 0,25 μm de diámetro, en las siguientes condiciones: Gas portador Helio 1,8 mL/min, $T_i=250^\circ\text{C}$, $T_d=230^\circ\text{C}$, Horno ($T_0=200^\circ\text{C}$, 1 minuto, velocidad= 25°C/min , $T_1=220^\circ\text{C}$, 3 min, velocidad= 3°C/min , $T_2=250^\circ\text{C}$, 20 min, tiempo total= $34,8 \text{ min}$), relación de split=40:1. El análisis por GC-MS del producto indicó DBT-sulfóxido con una pureza mayor del 90%.

- **2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfonato: HBPS**

Se prepara una disolución de 10 g de o-hidroxibifenil (59 mmol) en 50 mL de cloruro de metileno, que se añade a una segunda disolución de 4,7 mL de cloruro de tionilo (64 mmol) en 50 mL de cloruro de metileno, a 0 °C en helio seco. Después se adicionan 82 mL de trietilamina (58 mmol) por goteo durante 5 minutos. La mezcla se agita a 0 °C durante 25 minutos y a 25 °C durante 15 minutos más. Se añaden, con agitación vigorosa, una suspensión de 16 g de cloruro de aluminio (120 mmol) en 250 mL de cloruro de metileno, a 0 °C en helio seco. Se obtiene una disolución de color verde oscuro que se mantiene en agitación durante una hora a 0 °C, y después a 25 °C durante 12 horas. Se añaden 250 mL de agua, se filtra, se lava con 300 mL de ácido 3N, se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora el disolvente. Así se obtiene un aceite rojo-anaranjado (9,02 g y rendimiento: 71%) que cristaliza rápidamente: Mp 94-97 °C. Este producto se analiza por GC/MS (HP6890 GC-MS, con detector MSD 5973), empleando una columna HP-INNOWAX (Crosslinked PEG) 30 m x 0,25 mm con partículas de 0,25 µm de diámetro, en las siguientes condiciones: Gas portador Helio 1,8 mL/min, T=250 °C, T_D=230 °C, T₀=250 °C, tiempo total 30 minutos, relación de split=40:1. El análisis por GC-MS del producto mostró la obtención de HBPS con una pureza mayor del 95%.

2.1.3 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS EMPLEADOS

En este apartado, se describe la composición de los medios empleados en la obtención, mantenimiento y conservación del biocatalizador (Martín y col., 2004), así como la composición de la disolución tampón empleada en los ensayos de desulfuración.

- **Medio LB** (Luria-Bethany): es un medio complejo, que se emplea para el crecimiento rápido de los microorganismos; en este trabajo se utiliza para la preparación de inóculos, a fin de obtener biocatalizador o *stocks* para su conservación. Su composición es la siguiente.

➤ Extracto de levadura	10 g/L
➤ Cloruro de sodio.....	10 g/L
➤ Triptona	5 g/L
➤ Tetraciclina.....	25 µg/mL

- **Medio BSM** (Basal Salt Medium): es un medio sintético, de composición definida, que se emplea para el cultivo de microorganismos en condiciones controladas. Se le añaden las fuentes de carbono, nitrógeno y azufre en formas asimilables por el microorganismo, junto con determinados oligoelementos necesarios para su crecimiento. A continuación se enumeran los compuestos que forman parte de este medio y su concentración final en el mismo.

➤ NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	4 g/L
➤ K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4 g/L
➤ NH ₄ Cl ..	2 g/L
➤ MgCl ₂ · 6H ₂ O.....	0,0245 g/L
➤ CaCl ₂ · 2H ₂ O.....	0,001 g/L
➤ FeCl ₃ · 6H ₂ O.....	0,001 g/L
➤ Sulfato de magnesio:	0,4437 g/L
➤ Glicerol.....	0,0245 g/L
➤ Ácido L-glutámico	20 g/L

- Isopropil- β -D-tiogalctopiranosido.....2 μ g/L
- Tetraciclina.....25 μ g/mL

Para la formulación de este medio se han empleado cuatro disoluciones madre A, B, C y D, de las que se han tomado los volúmenes necesarios para alcanzar la concentración final deseada en un volumen final de 2 L (incluyendo el volumen de inóculo). La composición de estas cuatro disoluciones se muestra en la Tabla 2.5.

- **Tampón: HEPES** (N-2-Hidroxietil)-piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico) en agua destilada es el medio en que se realizaron los experimento para evaluar la capacidad para desulfurar del biocatalizador. Es un compuesto con capacidad de tamponar el medio sin que pueda ser utilizado como nutriente por parte del microorganismo. La concentración empleada se muestra en la Tabla 2.6.

TABLA 2.5 - Composición de la disolución A.

<i>Disolución A</i>	
➤ NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	40 g/L
➤ K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40 g/L
➤ NH ₄ Cl ..	20 g/L
<i>Disolución B</i>	
➤ MgCl ₂ · 6H ₂ O.....	50 g/L
<i>Disolución C</i>	
➤ CaCl ₂ · 2H ₂ O.....	0,50 g/mL
<i>Disolución D</i>	
➤ FeCl ₃ · 6H ₂ O.....	0,50 g/mL

TABLA 2.6 Composición de la disolución tampón HEPES.

<i>Disolución reguladora HEPES (50 mM)</i>	
➤ (N-2-Hidroxietil)-piperazine-N'-(2-ácido etanosulfónico).....	12 g/L

2.1.4 EQUIPOS

A continuación, se enumeran las características de los equipos empleados para la manipulación, cultivo y evaluación de la actividad desulfurante del microorganismo.

Autoclave

La esterilización de todos los materiales y medios empleados se ha realizado en un autoclave de la marca RAYPA, serie “Sterilmatic-C”, modelo AE-110, que alcanza los 2,2 bares de presión.

Estufa de cultivo

Se ha utilizado una estufa de cultivo bacteriológica de convección natural de la marca HERAEUS, tipo B6, para el cultivo del microorganismo en medio sólido. Permite regular la temperatura en un intervalo de 5 a 70 °C y tiene una estabilidad de temperatura menor o igual a 1 °C en el espacio y menor o igual a 0,2 °C en el tiempo a 37 °C.

Estufa de secado

La estufa es de la firma SELECTA, modelo S-202 y cuenta con termómetro de referencia, termostato de regulación de la temperatura y termostato de seguridad. La temperatura se puede regular en un intervalo de temperatura de 40 a 200 °C, con una estabilidad del 0,5%

Balanza de precisión

Para la cuantificación del peso de los diferentes compuestos empleados se ha utilizado una balanza digital marca SARTORIUS, modelo Handy. Esta balanza permite obtener pesadas del orden de miligramos con una precisión de $\pm 0,1$ mg.

Cámara de flujo

La manipulación de los microorganismos, medios y materiales estériles se ha llevado a cabo en condiciones de esterilidad empleando una cámara de flujo laminar vertical marca TELSTAR, modelo Micro-V/PCR, capaz de alcanzar una velocidad de impulsión de 0,45 m/s. Consta de un impulsor de aire y un filtro de tamaño de poro adecuado para evitar la entrada de otras bacterias. Dispone de una lámpara de luz

ultravioleta para esterilizar el interior. En la Figura 2.3 (a) se muestra una fotografía de este equipo.

Centrífuga

Para la centrifugación de muestras se ha empleado una centrífuga de mesa refrigerada programable de la marca SIGMA, modelo 4K15. El intervalo de temperatura en el que opera es de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la Figura 2.3 (b) se presenta una fotografía de este aparato. Presenta las siguientes características:

- Dispone de los rotores intercambiables:
 - Rotor de botes 6x250 mL, con aceleración máxima de 13130 g.
 - Rotor de tubos 20x10 mL, con aceleración máxima de 21480 g.
 - Rotor de *Eppendorf* 30x1,5-2,2 mL, con aceleración máxima de 25160 g.
- Refrigeración en el interior
- Velocidad máxima de giro: 15000 rpm.
- Campo rotatorio máximo: 22570 g
- Par máximo: 63897 N-m

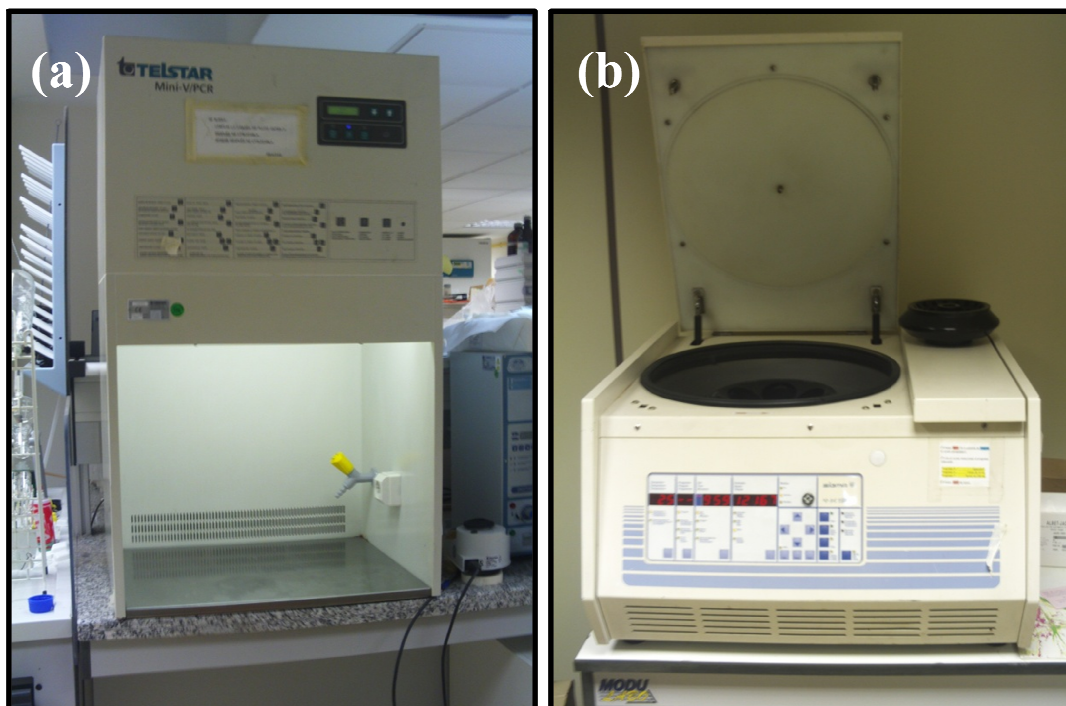


FIGURA 2.3 - (a) Fotografía de la cámara de flujo Telstar Micro-V/PCR. (b) Fotografía de la centrífuga SIGMA 4K15.

Electrodo de pH

Se ha utilizado un pH-metro de la casa CRISON, modelo BASIC 20, con electrodo de cuerpo de cristal y de aplicación general, con intervalo de medida de -2,00 a 16,00 unidades de pH. Su error de medida es de $\pm 0,02$ unidades de pH y la reproducibilidad de $\pm 0,01$ unidades de pH.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

El cromatógrafo empleado es de la marca Agilent Series 1100 con detector UV que incorpora un *diodo de array*. Se muestra una fotografía de este equipo en la Figura 2.4. Este aparato consta de varios módulos:

- Una bomba cuaternaria que introduce automáticamente el caudal del eluyente en la columna.
- Un sistema de inyección automático con un portaviales y brazo, que toma cada vial en el orden deseado, y lo lleva hasta la zona de inyección, donde la jeringa extrae una cantidad de muestra y la introduce en una válvula de seis vías. Desde aquí, se dirige a la columna arrastrada por el eluyente.
- Un horno para el control de la temperatura de la columna.
- Un detector UV-diodo de array. Consta de una lámpara de ultravioleta que ha de estabilizarse antes de comenzar la experimentación. Este equipo permite obtener el espectro de una muestra en todo el intervalo del UV.

El equipo de HPLC está controlado por ordenador mediante el software Agilent ChemStation® de Agilent Technologies. Este software está organizado en diferentes ventanas y vistas que permiten:

- Controlar el método y condiciones de inyección análisis de las muestras, así como la adquisición y almacenamiento de datos.
- Analizar los datos obtenidos mediante sistemas de integración y generar informes con los resultados de los cromatogramas obtenidos.
- Realizar tareas de verificación y diagnóstico del funcionamiento del equipo.
- Sintonización de cromatógrafo para su calibrado y adquisición de datos.



FIGURA 2.4 - Fotografía del cromatógrafo HPLC modelo Agilent Series 1100

Espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible

La medida de absorbancia de las muestras se ha realizado en un espectrofotómetro UV/VIS de la firma SHIMADZU, modelo UV 1603. Las características técnicas que reúne son las descritas a continuación.

- Intervalo de medida de la longitud de onda: 190-1100 nm.
- Anchura de banda espectral: 2 nm.
- Lámpara de Deuterio (lámpara D2), la fuente de la luz está en el intervalo del ultravioleta.
- Lámpara Halógena de Tungsteno (lámpara WI), la fuente de luz está en el intervalo del visible y el infrarrojo próximo.

Equipo para electroforesis y transferencia Western-Blot

Para la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida y su transferencia a membranas se empleó un Mini polyacrylamide gel system MiniProtean 3 de BIO-Rad. Se muestra una foto de este equipo en la Figura 2.5 (a)

- Dimensiones: 120x160x180
- Peso 2,0 kg

- Tamaño máximo del gel: 80x73
- Número de geles que admite: hasta dos
- Tiempo típico para correr un gel PAGE-SDS: 45 minutos
- Potencia máxima: 15 W
- Límite de voltaje: 600 VDC

Cuantificación de las bandas de los geles de poliacrilamida

Tras el escaneado de la membrana a la que se transfieren las bandas, se cuantificó la intensidad de las mismas, empleando el *software Quantity One de Bio-Rad*. En la Figura 2.5 (b) se muestra un aparato de escáner utilizado para este fin.

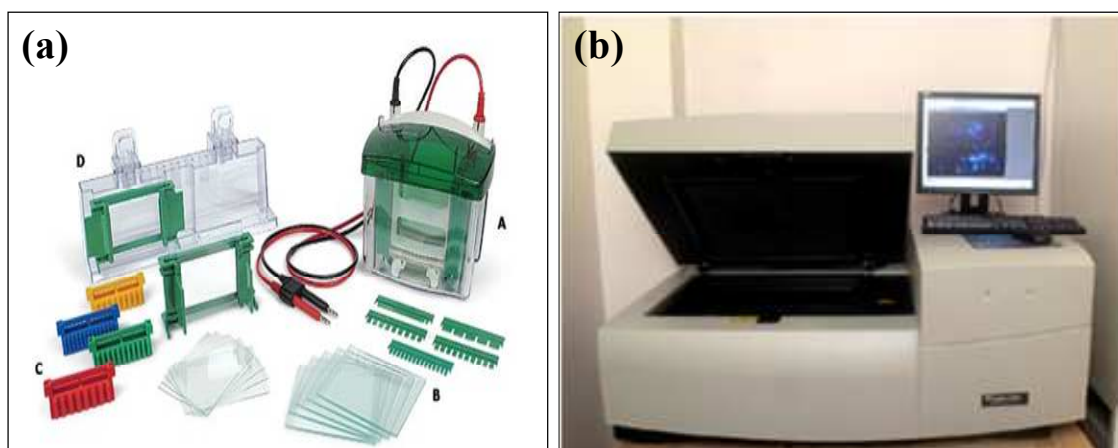


FIGURA 2.5 - (a) Fotografía del equipo de electroforesis Mini Protean 3 de BIO-Rad. (b) Fotografía de un escáner para la digitalización de geles.

Biorreactores

Los experimentos para la obtención de células de *Pseudomonas putida* CECT5279 se llevaron a cabo en biorreactores comercializados por Sartorius BBI Systems. Se emplearon los modelos BIOSTAT® B y BIOSTAT® B plus que se muestran en las Figuras 2.6 (a) y (b), respectivamente.

Ambos modelos corresponden a biorreactores de tipo tanque agitado, constituidos por un tanque de cultivo y una unidad con sistema de medida, control y regulación de pH, temperatura, velocidad de agitación y concentración de oxígeno disuelto. En la Figura 2.7 se muestra el esquema del tanque de cultivo de estos dos modelos.

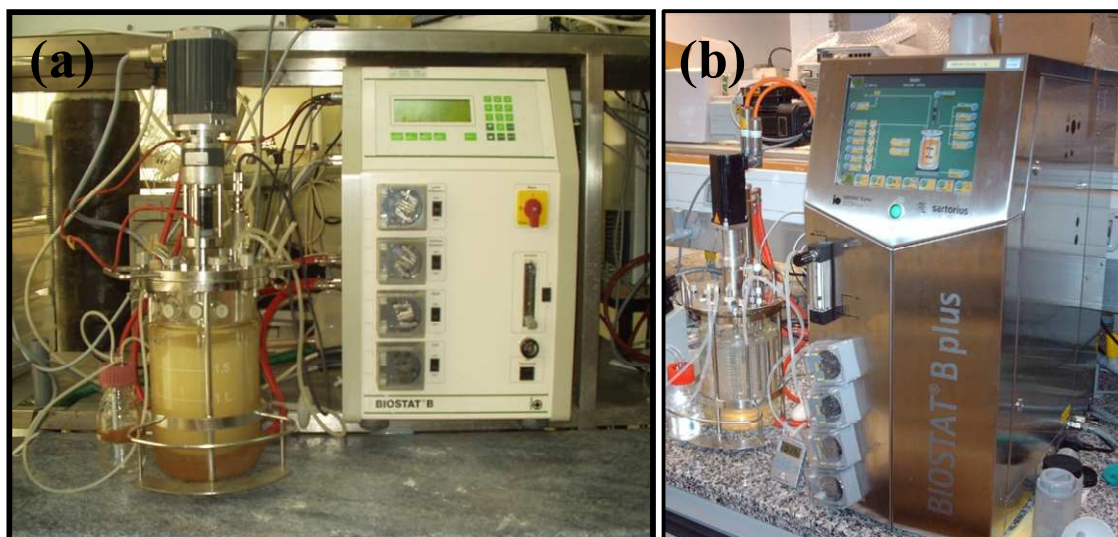


FIGURA 2.6 - Fotografías de los biorreactores modelos BIOSTAT B (a) y BIOSTAT B plus (b)

Tanque de Cultivo:

Está realizado en vidrio de borosilicato, con un volumen total de 3L y un volumen máximo de trabajo de 2L. Está constituido por una doble pared de vidrio y una tapa de acero inoxidable provista de orificios de diferentes diámetros para la conexión de sondas, condensador, membrana de inoculación y conexiones con otros recipientes.

Sistema de Medida y Control de la Temperatura:

Los biorreactores están equipados con un controlador digital PID. La temperatura del medio de cultivo, medida con un sensor de Pt-100 actúa como consigna para el control de temperatura, actuando sobre la válvula de refrigeración y la resistencia eléctrica de 600W. La temperatura de operación es seleccionada y ajustada mediante un indicador digital, con una sensibilidad de 0,1 °C. El intervalo de medida se encuentra entre 0 y 100 °C.

Sistema de Medida y Control de la Agitación:

La velocidad de agitación en los biorreactores se regula mediante un controlador digital PID ajustando la velocidad a través de un motor de 180W de potencia máxima, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de seis palas planas. La velocidad de agitación se mide con un tacómetro ajustable entre 0 y 1200 rpm, con una resolución de 10 rpm.

La aireación de la cuba se consigue suministrando aire, por burbujeo, mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0,2 μm , para conseguir la esterilización del aire que se introduce en el reactor. El aire se distribuye en el

interior mediante un difusor toroidal. El caudal de aire es ajustado mediante una válvula y medido por un rotámetro; se puede regular automáticamente, cuando se trata de controlar la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido.

Sistema de Medida y Control del pH:

Se realiza también con un controlador digital PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y de base en función de la señal de medida, previamente amplificada. Se utiliza un electrodo HAMILTON, cuyo rango de medida varía entre 2 y 12 unidades de pH. La calibración se realiza con un sensor digital.

Sistema de Medida y Control del Oxígeno Disuelto:

Hay dos tipos de controlador, dependiendo del proceso. Se pueden seguir las siguientes estrategias de control:

- control digital PID del oxígeno disuelto en cascada, actuando directamente sobre la velocidad de agitación, es decir, sobre la velocidad de giro del agitador.
- controlador *Gasmix*, en cuyo caso el sistema de medida y control puede controlar la concentración de oxígeno disuelto actuando sobre la válvula de entrada de gas.

La medida de la concentración de oxígeno disuelto se realiza con un electrodo esterilizable HAMILTON, cuyo rango de medida varía entre 0 y 100 %.

En la Figura 2.8 se muestra una sección del tanque de cultivo, en la que se puede apreciar la situación de la turbina de agitación, el difusor de oxígeno y las sondas de nivel, temperatura y oxígeno disuelto. También se distingue la doble pared de la cuba de fermentación, que constituye la camisa para termostatizar el sistema.

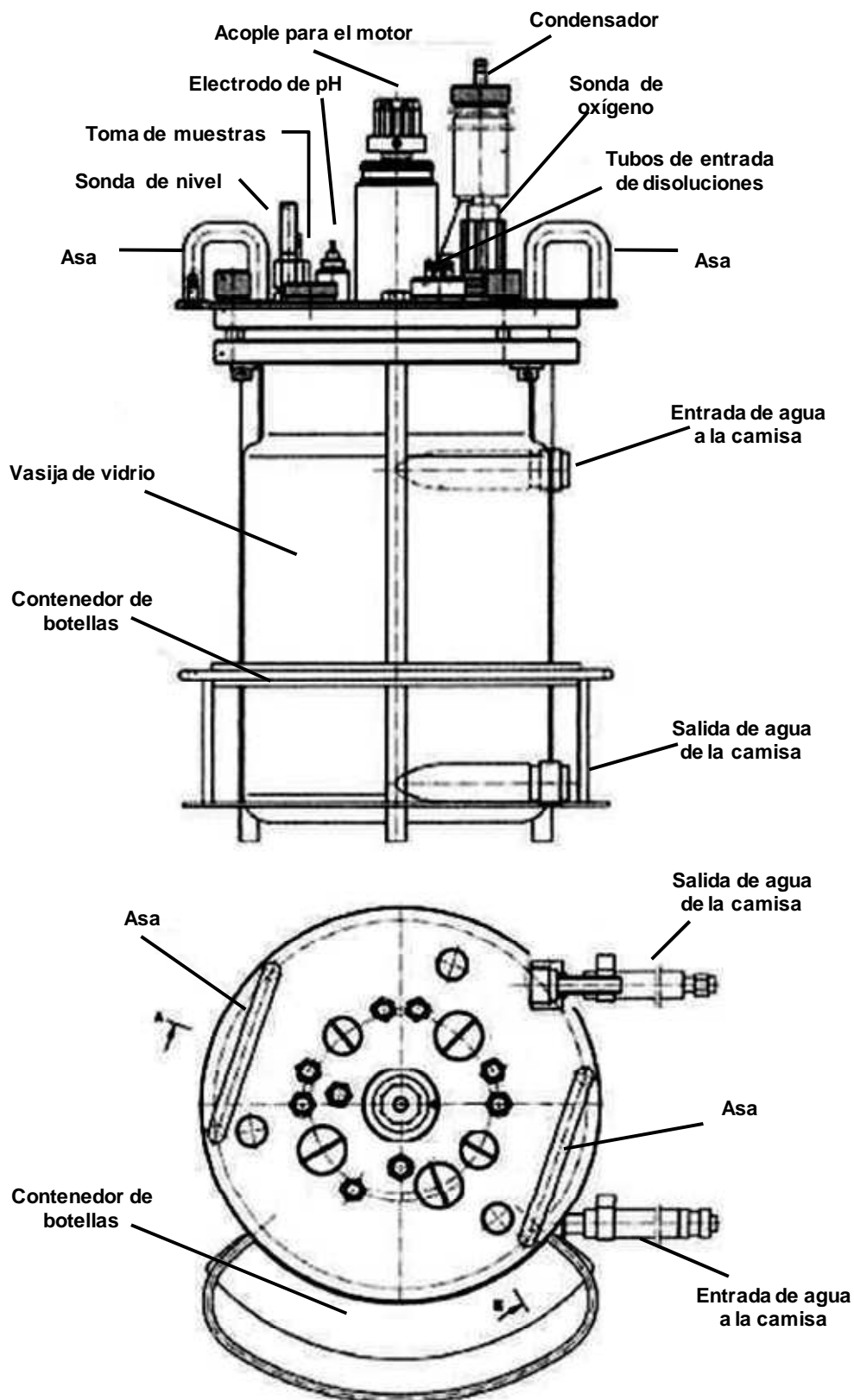


FIGURA 2.7 - BIostat B plus: esquema del tanque de cultivo y vista superior de la tapa del biorreactor

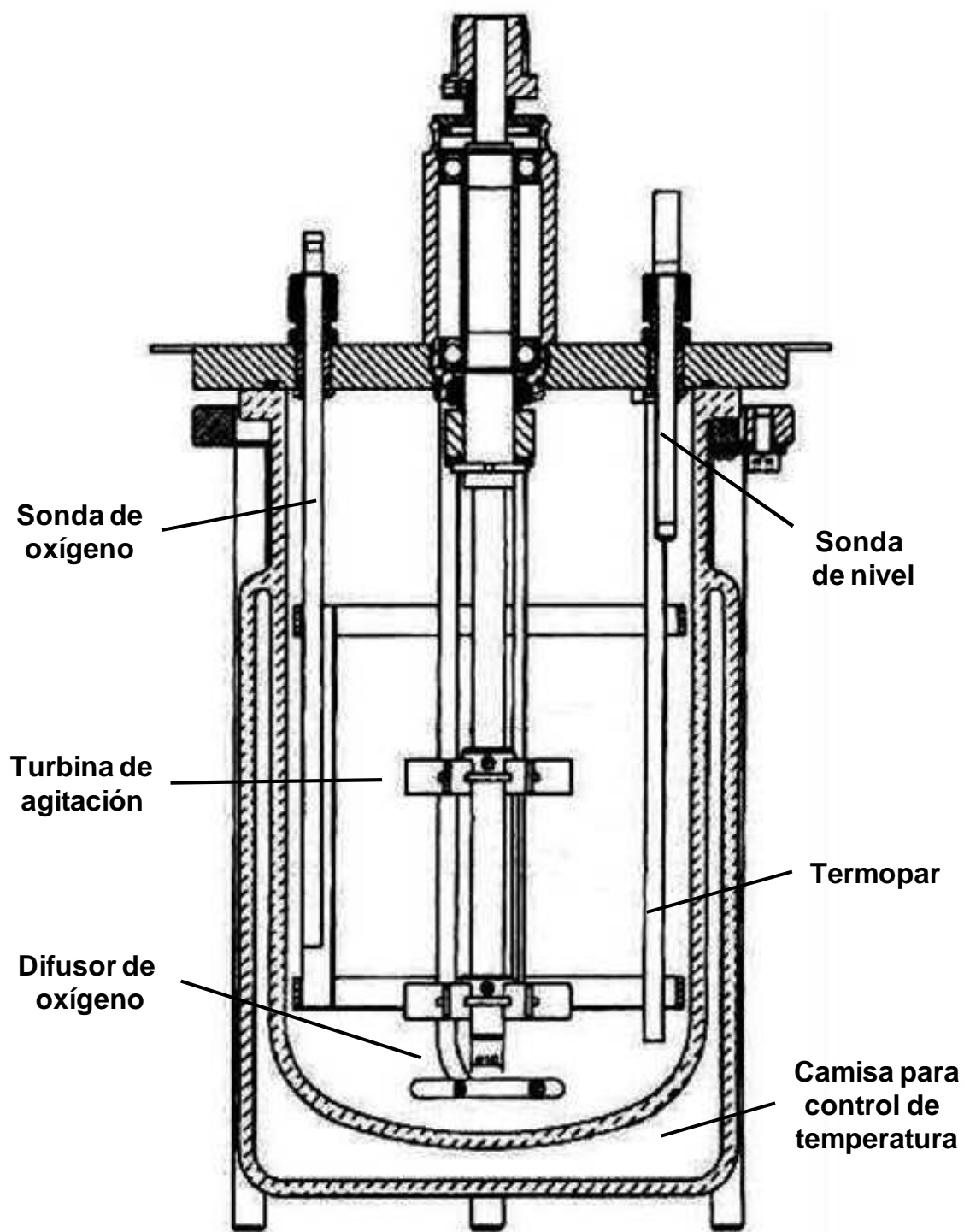


FIGURA 2.8 - Sección de la cuba de fermentación del biorreactor

Incubadora orbital

Para el crecimiento del microorganismo se ha utilizado una incubadora de la casa GALLENKAMP, modelo INR-200, con las siguientes características:

- Intervalo de temperatura: 5 °C a 70 °C.
- Fluctuación de temperatura en su interior: $\pm 0,1$ °C.
- Variación máxima de temperatura: $\pm 0,5$ °C.
- Intervalo de velocidad de agitación: 0-400 rpm.
- Radio orbital: 32 mm.
- Capacidad: 30 *Erlenmeyers* de 250 mL.

Sistema de purificación de agua

El agua que se ha empleado en la preparación de medios ha sido previamente desionizada y su contenido en materia orgánica reducido a límites adecuados. Se ha utilizado un equipo de purificación de Sartorius modelo Arium 611UV que permite obtener agua ASTM tipo I, de resistividad superior a $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25° C, carbono orgánico total menor de 1 ppb y contaminación bacteriana menor de 1 UFC/100 mL.

Ultrasonidos

Para favorecer la disolución de ciertos reactivos, así como para desgasificar los disolventes para HPLC, se ha empleado una unidad de ultrasonidos, de la firma SELECTA, dotada de un baño termostatzado con control de temperatura.

2.2 Protocolos experimentales

En este apartado se van a describir los métodos de análisis y los protocolos experimentales para realizar la experimentación necesaria para llevar a cabo este trabajo.

2.2.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS

Durante el cultivo de los microorganismos, y el seguimiento de los ensayos de desulfuración, se emplearon los métodos analíticos que se enumeran a continuación.

2.2.1.1 Seguimiento de la biomasa

La concentración de biomasa presente en el caldo se ha relacionado con la medida de absorbancia que presenta el medio. Así, conociendo este valor de absorbancia que presenta el cultivo a 600 nm, mediante un espectrofotómetro de UV-visible, se puede estimar el peso seco del microorganismo existente previo calibrado de la citada relación.

La curva de calibrado se obtuvo haciendo crecer el microorganismo en un medio de crecimiento complejo, medio LB. Se incubaron los cultivos en incubadora orbital a 210 rpm y 30° C hasta que se alcanzó una densidad óptica elevada. Las muestras se centrifugaron y se secó la biomasa en una estufa a 105 °C hasta pesada constante. Se emplearon diferentes diluciones del caldo con el fin de medir la absorbancia de cada una de las muestras. Con los pares de valores concentración de biomasa-absorbancia y mediante regresión lineal, se obtuvo la expresión tipo Lambert-Beer, recogida en la ecuación [2.1], que permite relacionar la absorbancia del caldo, con un valor de concentración de biomasa en base seca. Se emplea como blanco agua destilada.

$$C_X (\text{g peso seco /L}) = 0.621 * A (600) * \text{dilución} \quad [2.1]$$

La relación entre concentración de biomasa y absorbancia mantiene la linealidad entre valores de 0,100 y 0,900 unidades de absorbancia. A la hora de controlar la concentración de biomasa, antes, o durante los ensayos, se tomaron muestras del cultivo y se midió su absorbancia a 600 nm. En el caso de que el valor de absorbancia de una muestra tomada durante el crecimiento en el medio de cultivo, superase el extremo superior del intervalo de linealidad del calibrado, se diluye con agua destilada. El valor de absorbancia obtenido a 600 nm es convertido en concentración mediante las

ecuaciones anteriores, teniendo en cuenta la dilución realizada previamente. Se ha comprobado la validez de esta medida en medio BSM, para muestras tomadas del biorreactor. En la Figura 2.9 se muestran los resultados de un calibrado típico.

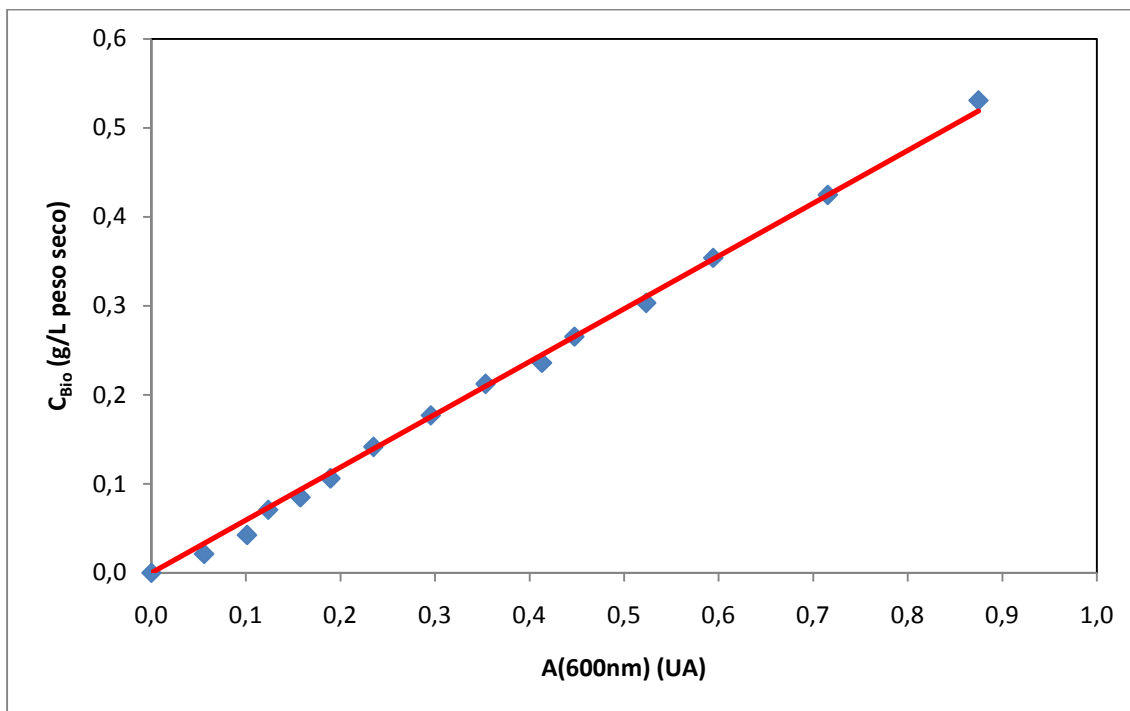


FIGURA 2.9 - Curva de calibrado para la relación de absorbancia a 600 nm y concentración de biomasa en peso seco para *Pseudomonas putida* CECT5279.

2.2.1.2 Medida de la cantidad de proteína celular total

Para estimar la cantidad de proteína celular a partir de muestras tomadas del caldo de cultivo, se empleó el método de Bradford.

El citado método se basa en la unión de un colorante, el azul de Coomassie, a las proteínas presentes en una muestra dada. Este colorante está presente en dos formas en solución ácida, una de color azul y otra naranja. La forma de color azul se une a las proteínas, y se genera un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Se trata de un método simple, rápido y barato, con un número reducido de interferentes (detergentes como el AEDT y determinadas soluciones básicas) (Bradford, 1976).

Se ha empleado una solución comercial de reactivo de Bradford. Esta solución consiste en una disolución acuosa de azul de Coomassie (10 mg por cada 100 mL de

volumen total), ácido fosfórico al 88% (10 mL por cada 100 mL) y de etanol absoluto (4,7 mL por cada 100 mL totales).

Las muestras obtenidas del biorreactor se mantuvieron durante 30 minutos en un baño a 100 °C para conseguir su ruptura. Se tomaron 7.5 µL de cada muestra y se pusieron en contacto con 1 mL del reactivo de Bradford. Las muestras permanecieron en obscuridad durante una hora para asegurar la estabilidad del color. Se midió la absorbancia que presentaba cada disolución a 595 nm en un espectrofotómetro.

Se empleó albúmina de suero bovino para realizar un calibrado de concentración de proteína frente a valores de absorbancia. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.10. La expresión de la curva de calibrado queda reflejada por la ecuación [2.2].

$$C_{prot} \text{ (g/L)} = 8.310 * A(595) * \text{dilución} \quad [2.2]$$

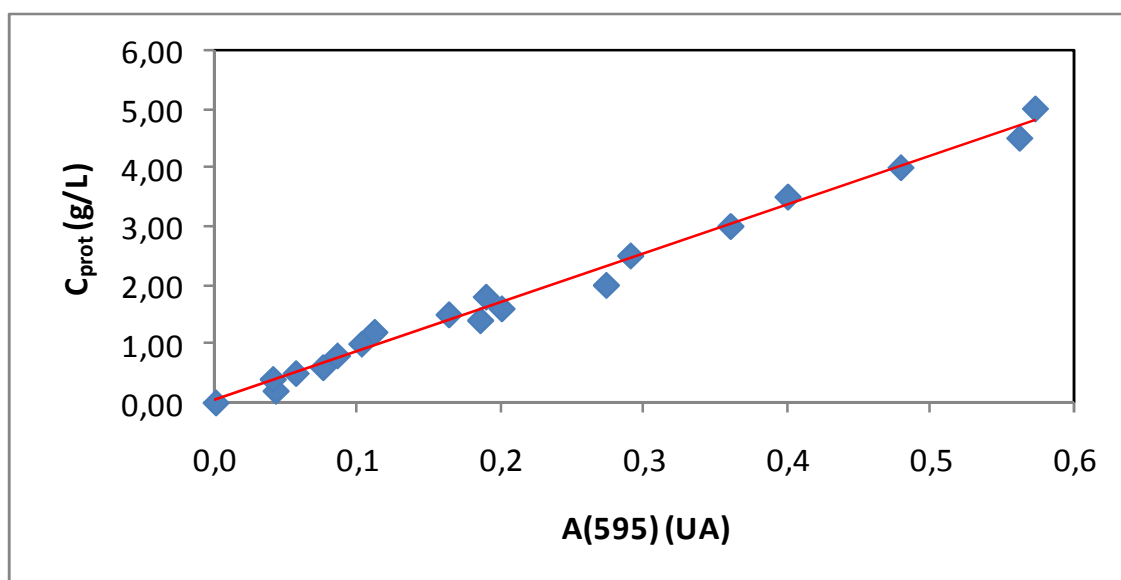


FIGURA 2.10 - Curva de calibrado para la relación entre concentración de albúmina de suero bovino y la medida de absorbancia a 595 nm.

2.2.1.3 Determinación de la concentración de la proteína DszB

En este apartado se describen los procedimientos experimentales para la cuantificación de la proteína DszB presente en muestras de biomasa tomadas del biorreactor. Se trata de una determinación por inmunoelectroforesis, una combinación entre una electroforesis en gel de agarosa para la separación de las proteínas, y la detección de las mismas mediante la aplicación de anticuerpos específicos.

El anticuerpo frente a DszB se obtuvo mediante la inyección subcutánea en conejos, del péptido sintético FFVRDDSPITAAA (correspondiente a los aminoácidos 103-115 de DszB de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8) conjugado a la proteína KLH, para aumentar su inmunogenicidad. La inmunización se realizó tres veces en intervalos de 10-15 días.

Como se indicó anteriormente, para la obtención del catalizador, se tomaron muestras del caldo de cultivo en el biorreactor a diferentes tiempos de crecimiento, que se recogieron en tubos y se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en una disolución de glicerol y suero salino. Antes de la resuspensión, se tomó una pequeña porción de *pellet*, que se guardó en un tubo *Eppendorf* y se conservó a -18°C. Estas muestras de biomasa a diferentes tiempos de crecimiento se utilizaron para llevar a cabo una electroforesis PAGE-SDS (Laemmli, 1970). Los extractos celulares se prepararon por ruptura de células mediante sonicación en un tampón fosfato pH 7.

Se realizaron pruebas previas para determinar experimentalmente las cantidades idóneas de proteína con las que se carga el gel de poliacrilamida, en relación con la cantidad de anticuerpo empleada, evitando sobresaturar el gel con cantidades que causaran la saturación de la señal. La cantidad óptima de proteína se estableció en un valor de 10 µg.

Para conocer la cantidad de proteínas totales presentes en cada muestra se aplicó el método Bradford (Bradford, 1976) con cada uno de las muestras, para después calcular el volumen necesario de extracto celular para cada muestra, tomada a diferentes tiempos de crecimiento, con el fin de cargar en el gel 10 µg de proteínas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se ha llevado a cabo con un 12,5% de SDS en condiciones reductoras, con DTT 1mM y EDTA 0,2mM. Después, el gel se equilibra utilizando un tampón de transferencia, que contiene Tris (3g/L), glicina (14,5 g/L) y metanol (0,2%). Para realizar la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa se aplicó una corriente de 300 mA durante una hora (Towbin y col., 1979). La membrana de nitrocelulosa se incubó en 50 mL de leche al 5% con albúmina de suero bovino (0,3%) tampón fosfato y Tween 20 (0,05%), para bloquear la superficie de la membrana no ocupada por las proteínas y evitar así uniones inespecíficas con los anticuerpos. También se incubó el anticuerpo primario, obtenido de la inoculación del conejo, durante toda una noche, a 30 °C. Al día siguiente, se lavó la membrana con

tampón fosfato y Tween 20 (0,05%) durante 15 minutos. Después, se incubó en 10 mL tampón fosfato y Tween diluido 25 veces durante 1h a 4 °C, con el anticuerpo primario. A continuación, se llevan a cabo dos lavados rápidos con tampón fosfato y Tween 20 (0,05%) y tres lavados de 5 minutos. Después, se incuba con el anticuerpo secundario (anticuerpo *anti-rabbit*) en una dilución de 1/20000 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados, uno de 15 minutos y tres de 5 minutos. La membrana se reveló poniéndola en contacto con 10 mL de *kit* ECL, que contiene un reactivo quimoluminiscente, durante una hora, se realizó la medida de densidad de las bandas generadas y se la cuantificación se realizó mediante el software Quantity One®.

2.2.1.4 Seguimiento de los compuestos de la ruta 4S

A la hora de estudiar la capacidad desulfurante del microorganismo, se trataron de analizar los diferentes compuestos generados en la ruta de desulfuración 4S.

El método de análisis desarrollado para DBT y el resto de los compuestos de la ruta 4S, se basa en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se ha empleado un cromatógrafo marca Hewlett-Packard serie 1100 con detector de *diodo de array*, descrito anteriormente. Se utilizó una columna C-18 Kromasil de 5 µm, con unas dimensiones de 150 x 4,6 mm. La fase móvil consiste en una mezcla de acetonitrilo y agua Mili Q. A lo largo del análisis, se lleva a cabo un gradiente doble, tanto de la composición de la fase móvil como del caudal de la misma, que se muestran en la Tabla 2.7.

Los volúmenes de muestras tomados se recogieron sobre idénticos volúmenes de acetonitrilo y se acidificaron añadiendo 75 µL de HCl 35% por cada 0,5 mL de muestra. Los picos de los compuestos de la ruta 4S se monitorizaron a las longitudes de onda y tiempos de retención que se recopilan en la Tabla 2.8 y se esquematiza en la Figura 2.11. Las ecuaciones de calibrado que se obtienen para cada uno de los cinco compuestos de la ruta, correspondientes a las rectas que se muestran en las Figuras 2.12 a 2.16 se recogen en las siguientes ecuaciones:

$$C_{DBT} = 0.12597 + 0.02237 \cdot A_{14,2}(234) \quad [2.3]$$

$$C_{DBTO} = -0.02805 + 0.05111 \cdot A_{2,8}(220) \quad [2.4]$$

$$C_{DBTO_2} = 0.022440 + 0.02459 \cdot A_{3,7}(234) \quad [2.5]$$

$$C_{HBPS} = 0.93552 + 0.06812 \cdot A_{8,3}(206) \quad [2.6]$$

$$C_{HBP} = -0.22634 + 0.04694 \cdot A_{9,2}(206) \quad [2.7]$$

TABLA 2.7 - Evolución de las condiciones de la fase móvil durante el análisis mediante HPLC

Tiempo de análisis	Composición	Caudal	Tiempo de análisis	Composición	Caudal
min	% Acetonitrilo	mL/min	min	% Acetonitrilo	mL/min
0,0	50	1,0	8,0	40	2,5
2,5	50	1,5	12,0	70	2,5
3,0	30	1,5	16,0	60	1,5
4,0	20	1,5	17,0	50	1,0
5,0	30	1,5	19,0	50	1,0

TABLA 2.8 - Tiempos de retención y longitudes de onda para la monitorización de los compuestos de la ruta 4S mediante HPLC

Compuesto	Tiempo de retención	Longitud de onda
	Minutos	Nm
DBT	14,2	234
DBTO	2,8	220
DBTO ₂	3,7	234
HBPS	8,3	206
HBP	9,2	206

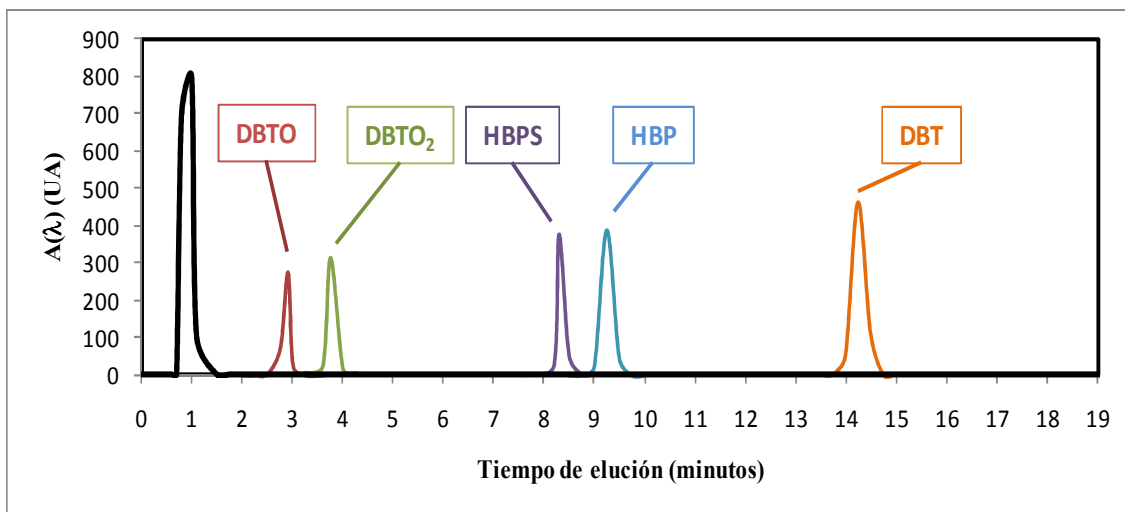


FIGURA 2.11 - Cromatograma tipo en el análisis de los compuestos de la ruta 4S mediante una columna Kromasil C-18

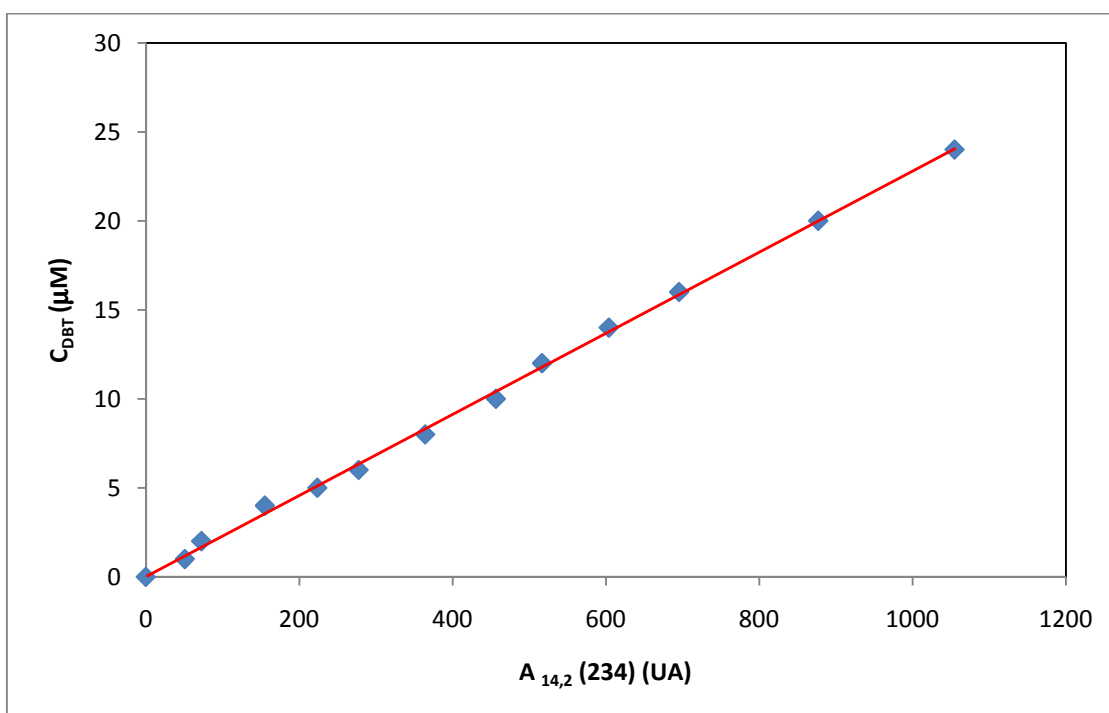


FIGURA 2.12 - Recta de calibrado que relaciona la concentración de DBT y su correspondiente área de pico.

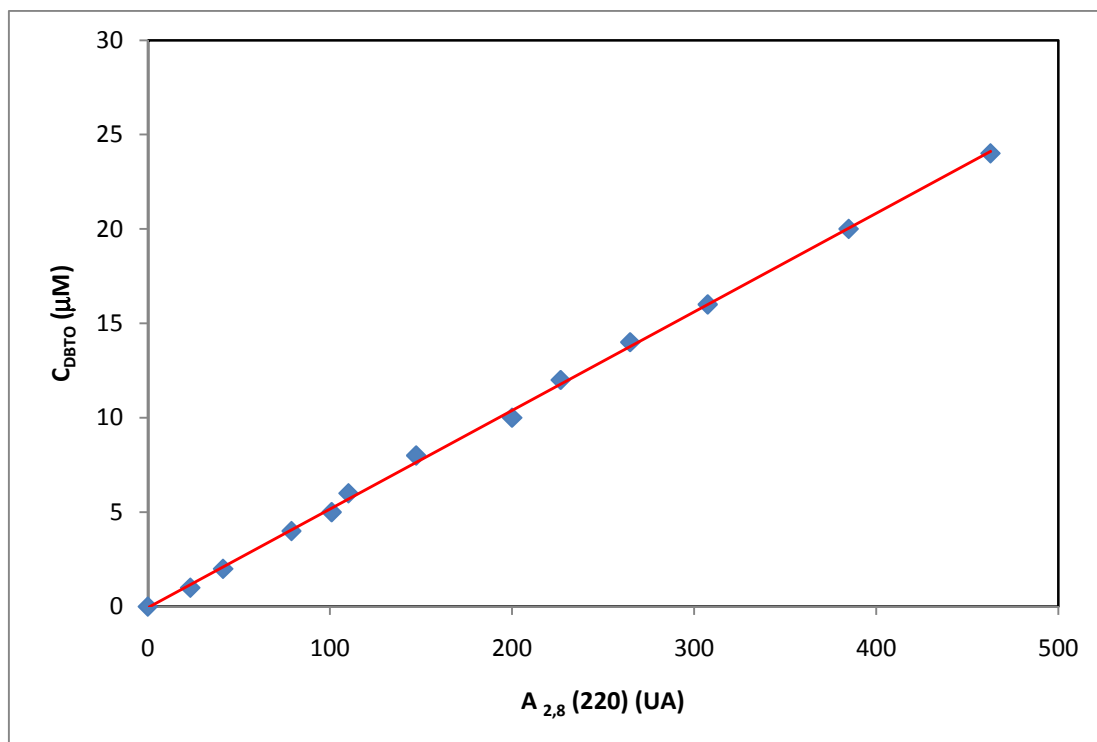


FIGURA 2.13 - Recta de calibrado que relaciona la concentración de DBTO y su correspondiente área de pico.

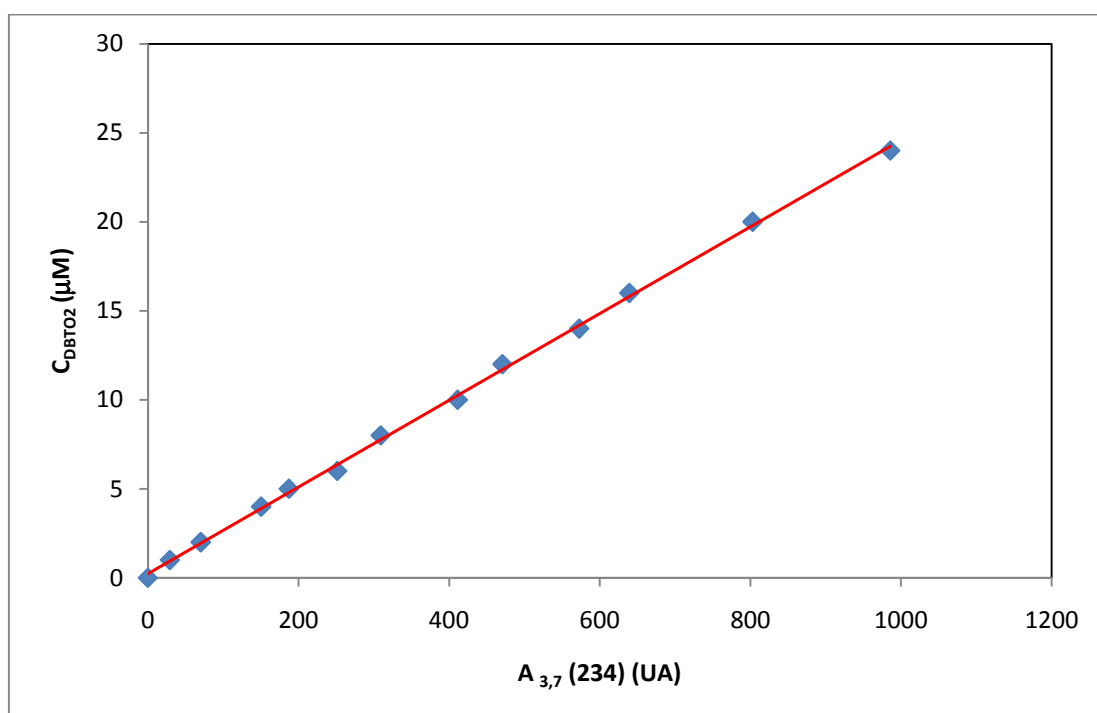


FIGURA 2.14 - Recta de calibrado que relaciona la concentración de DBTO₂ y su correspondiente área de pico.

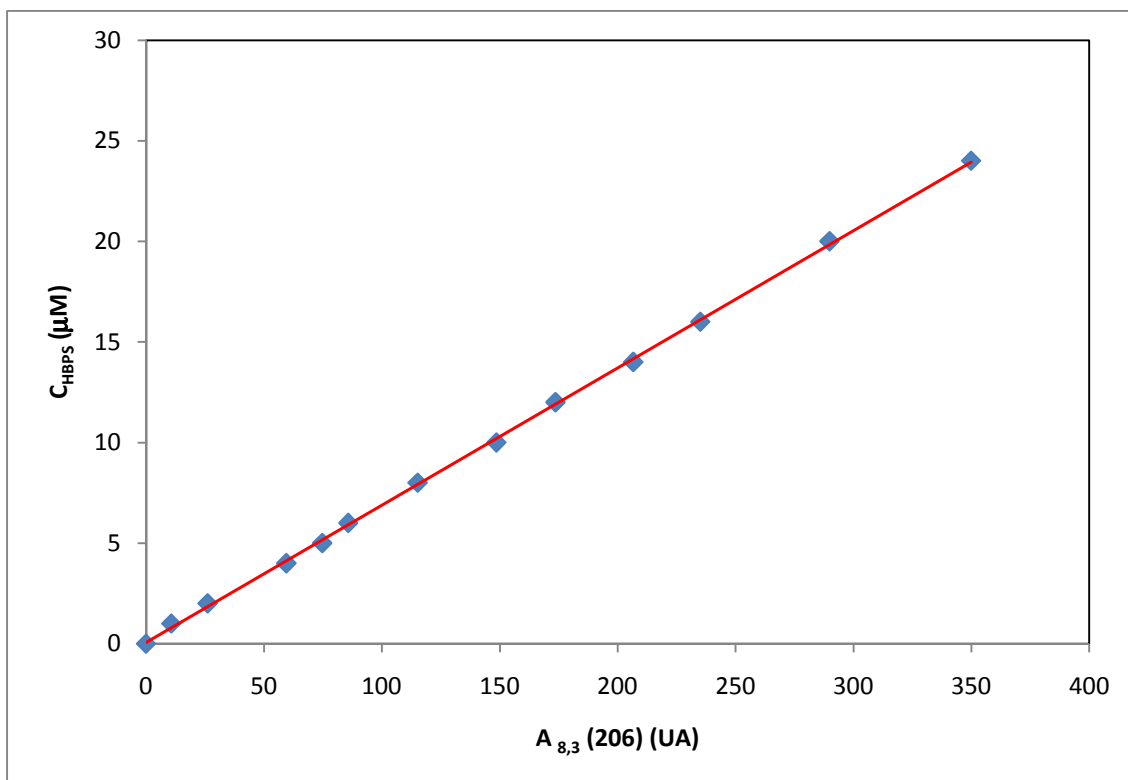


FIGURA 2.15 - Recta de calibrado que relaciona la concentración de HBPS y su correspondiente área de pico.

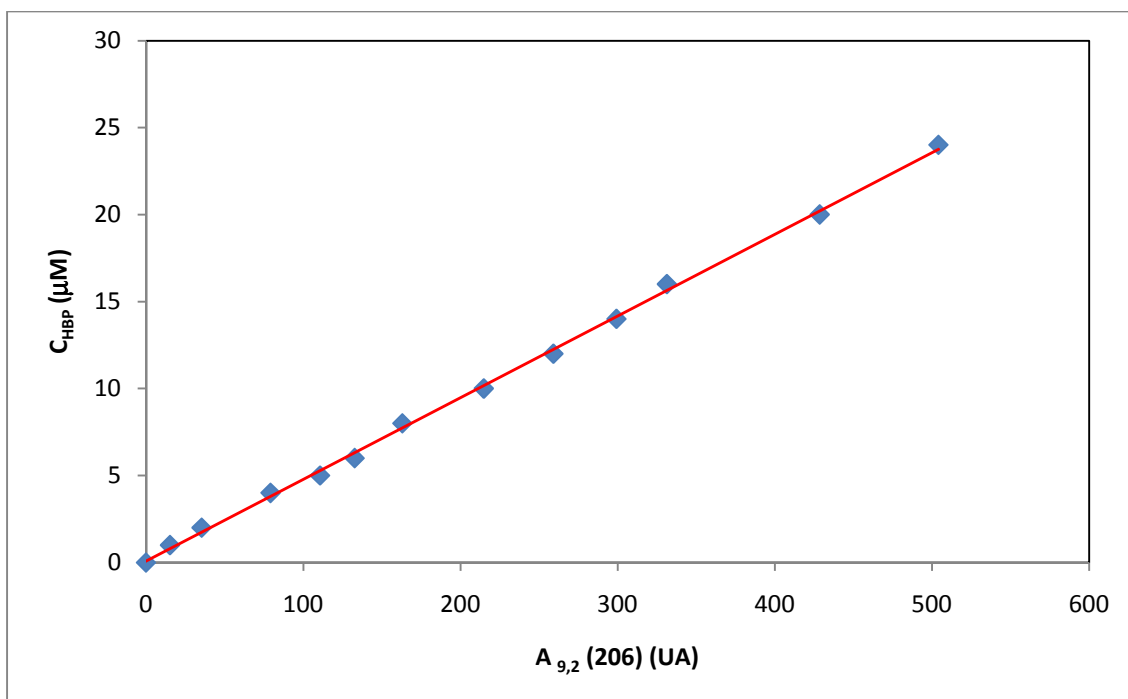


FIGURA 2.16 - Recta de calibrado que relaciona la concentración de HBP y su correspondiente área de pico.

2.2.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

En este apartado se describen los procedimientos empleados en este trabajo para llevar a cabo la experimentación, relacionados con la obtención de células del biocatalizador, el desarrollo de experimentos en condiciones de células en reposo y la medida de actividades de las enzimas implicadas en la ruta 4S.

2.2.2.1 Obtención del biocatalizador

A fin de obtener resultados repetitivos, y realizar experimentos con células de capacidad desulfurante desarrollada y adaptadas al medio final de trabajo, en la obtención del biocatalizador se ha seguido un protocolo estandarizado que comprende los pasos que se enumeran a continuación y se esquematiza en la Figura 2.17.

- A. Conservación de cepas.
- B. Preinóculo de las células en un medio de cultivo complejo para su reactivación, e inoculación en el medio complejo a fin de lograr el crecimiento celular en las condiciones óptimas.
- C. Cultivo en un medio sintético para conseguir que el microorganismo exprese los genes desulfurantes.
- D. Conservación de las células adaptadas

A. Conservación del microorganismo

El Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del C.S.I.C. proporciona la cepa de *Pseudomonas putida* en placa de agar. Esta placa se incuba a 30 °C durante 24 h. Desde la placa, se siembra en 50 mL de medio líquido LB en *Erlenmeyer* de 250 mL y se mantiene en incubadora orbital a 30 °C y 210 rpm hasta que el microorganismo alcanza la segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento. Las células se separan del medio de cultivo por centrifugación durante 5 minutos a 9000 rpm. Se elimina el medio sobrenadante y se resuspenden en una disolución al 50% de glicerina y suero salino (0.9% NaCl) El resuspendido se conserva en congelador a -80°C en volúmenes de 1mL guardados en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL de capacidad.

B. Obtención del inóculo

Las células conservadas adoptarán un estado de latencia. Su adaptación al medio de cultivo y la rapidez para alcanzar la fase exponencial de crecimiento influyen directamente en la capacidad desulfurante del microorganismo (Martín, 2005). Por ello, cuando se emplea el *stock* congelado para obtener biocatalizador, las células se cultivan en dos etapas distintas (preinóculo e inóculo) que permiten su adaptación al medio en el que se realizará el estudio, y así, lograr condiciones metabólicas idóneas y reproducibles (Martín, 2005).

El preinóculo se obtiene haciendo crecer primero las células en un medio complejo (LB) para conseguir la adaptación celular y, así, la expresión del material genético necesario para producir las enzimas en ese medio. En matraces *Erlenmeyer* de 250 mL, con 50 mL de medio LB y 250 μ L de tetraciclina, se inoculan 0,5 mL de *stock* congelado, tras atemperarlo ligeramente. Los matraces se mantienen a 30 °C y 210 rpm en incubadora orbital durante 12 horas.

El inóculo es un segundo crecimiento del microorganismo en medio LB, a partir del preinóculo, que ha alcanzado el final de la fase exponencial de crecimiento, con el objetivo de obtener células en un estado metabólico similar. Se inocula en matraces *Erlenmeyer* con 50 mL de medio LB, el volumen de preinóculo necesario para tener una concentración inicial de 0,1 g/L. El inóculo se incuba en las mismas condiciones que el preinóculo durante 4 horas.

C. Crecimiento del microorganismo

Se calcula la cantidad de inóculo que es necesario introducir en un biorreactor con 1600 mL de medio BSM y 200 mL de disolución saturada de ácido glutámico, para alcanzar un volumen total de 2 L con en una concentración inicial de biomasa de 0,1 g/L, tras la inoculación de la cepa microbiana. El medio tiene sulfato magnésico como fuente de azufre, IPTG como inductor de la ruta y tetraciclina para evitar, en la división celular, la pérdida del plásmido pESOX3. En el biorreactor se introduce un caudal de aire de 1 L/L/min y se termostatiza a 30 °C.

D. Obtención de células a diferentes tiempos de crecimiento

En condiciones de esterilidad, se extraen del biorreactor muestras a diferentes tiempos de crecimiento. Para obtener el biocatalizador, se centrifugan las células a 9000

rpm durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante. El *pellet* se resuspende en la disolución al 50% glicerina y suero salino (0,9% NaCl) en el volumen adecuado para alcanzar una concentración de biomasa alrededor de 10 g/L. El resuspendido constituye el biocatalizador para los ensayos de biodesulfuración. Se conserva a -18°C.

En la Figura 2.18, se representa de manera esquemática el procedimiento para obtener células para los ensayos de desulfuración.

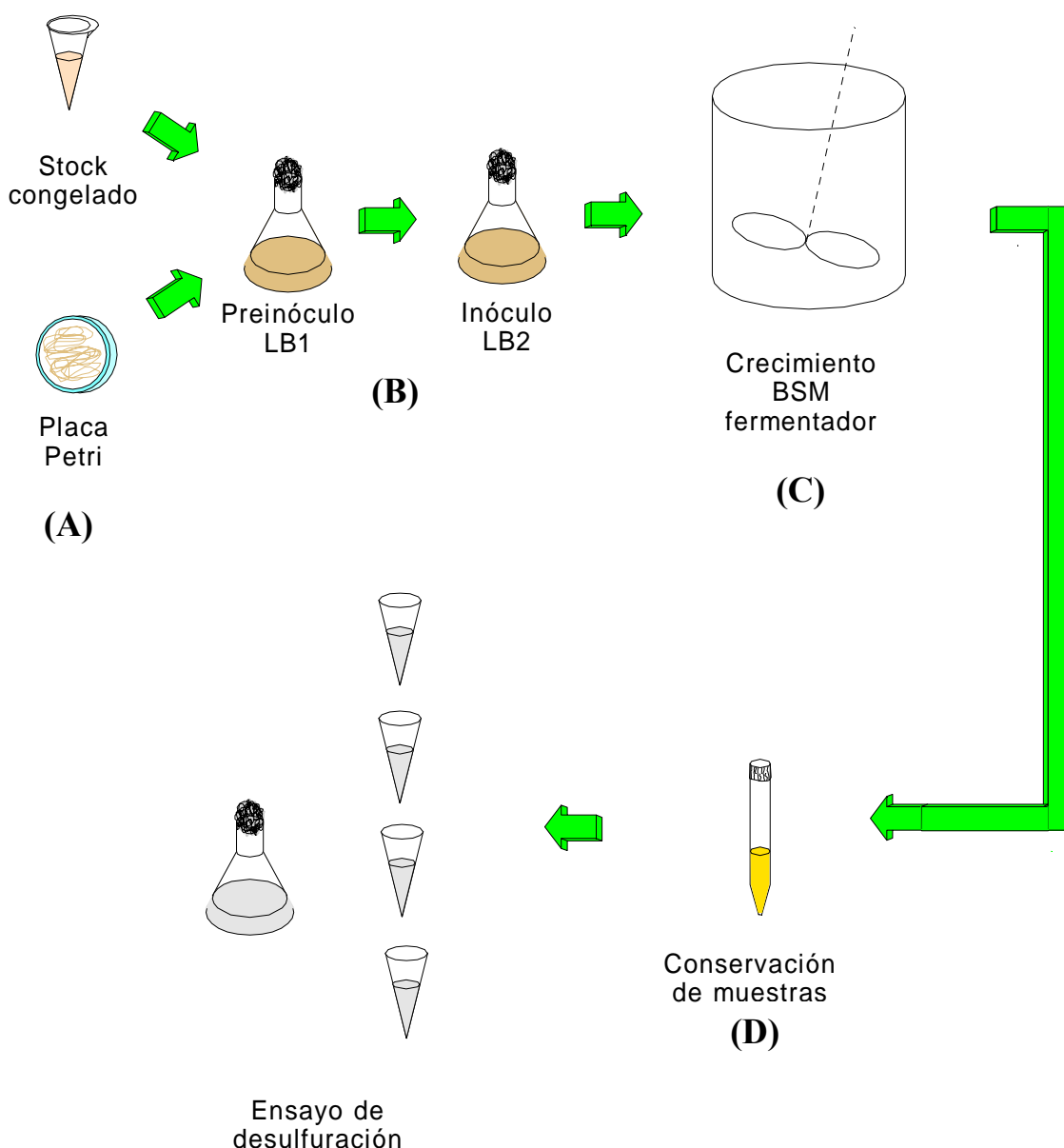


FIGURA 2.17 - Esquema del protocolo de obtención del biocatalizador

2.2.2.2 Experimentos de desulfuración en *resting cells*

Se trata, como ya se ha comentado, de experimentos con “células en reposo” (referidos en bibliografía como *resting cells*). El medio de reacción en el que se llevan a cabo estos experimentos no debe contener ningún nutriente que pueda ser empleado por las células para su crecimiento. Por esta razón, y para controlar el valor de pH en torno a un valor de 8, se emplea un tampón biológico HEPES.

Cada experimento se lleva a cabo en un *Erlenmeyer* de 100 mL tapado con algodón y autoclavado. Se trabaja con 16 mL de HEPES, sobre el que se añade, cuando el matraz esté frío, el volumen necesario del sustrato azufrado empleado (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS) para disponer de la concentración inicial deseada. Durante el ensayo, los *Erlenmeyer* necesarios se incuban en un baño termostatzado a 30 °C y con una agitación de 250 rpm.

Es preciso conocer la concentración de biomasa disponible en los tubos tipo *falcon* en que se conserva el biocatalizador. Para ello, se mide la absorbancia mediante un espectrofotómetro UV-visible a 600 nm como se explicó con anterioridad. De esta forma, se calcula el volumen que deberá inocularse para ajustar la concentración de biomasa deseada en el *Erlenmeyer*.

La toma de muestras se realiza tomando alícuotas de 0,5 mL del medio de reacción con una pipeta automática. La muestra a “tiempo cero” se toma nada más inocular las células; a partir de ese momento, a intervalos regulares de veinte, treinta o sesenta minutos, se toman nuevas muestras, según el ensayo. Cada una de ellas se recoge en un tubo *Eppendorf* preparado con 0,5 mL de acetonitrilo (cuya misión es detener la reacción y solubilizar los compuestos de la ruta 4S) para su posterior análisis mediante cromatografía de HPLC.

Después de cada experimento, se separa el caldo de reacción de las células por centrifugación. Los tubos *Eppendorf* se introducen en una ultracentrífuga durante 1,5 minutos a 14000 rpm. Mediante una pipeta automática, se toman 0,7 mL de cada *Eppendorf* y se lleva a un vial de cristal.

Mediante las técnicas de análisis anteriormente expuestas en el Apartado 2.2.1.4 del presente capítulo y las que se desarrollan en el siguiente apartado, se realizó el seguimiento de los compuestos de partida y los formados de acuerdo a la ruta 4S, todas ellas especies presentes en el caldo.

2.2.2.3 Medida de actividad enzimática

La actividad de cada una de las enzimas involucradas en esta ruta se ha definido como el valor de la pendiente de la variación de concentración el sustrato azufrado, referido a la concentración de biomasa del ensayo, y extrapolando a tiempo cero, según:

$$a_i = - \left. \frac{dC_j}{C_X \cdot dt} \right|_{t=0} \quad [2.8]$$

Para cada uno de los sustratos de cada reacción $i = \text{DBT, DBTO, DBTO}_2$ o HBPS.

El estudio de las actividades enzimáticas de la ruta 4S se ha realizado a partir de ensayos en *resting cells* con células obtenidas a diferentes tiempo de crecimiento y conservadas a -18 °C, empleando, individualmente, DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS como sustratos azufrados (10 μM). El desarrollo de estos ensayos con células en reposo es análogo al que se ha descrito en el apartado anterior.

Las características particulares de *Pseudomonas putida* CECT5279 permiten realizar la medida de las actividades enzimáticas intracelulares a partir de los datos obtenidos en el caldo de cultivo directamente, es decir, *in vivo*. Se sabe, por trabajos anteriores, que ninguno de los compuestos implicados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) experimentan limitaciones a su transporte a través de la membrana celular del microorganismo (Alcón y col., 2005). Asimismo, se conoce que las concentraciones de equivalentes reducidos y de poder reductor en la célula a lo largo de la curva de de crecimiento de *P. putida* CECT5279 no afectan a la capacidad desulfurante del biocatalizador (Alcón y col., 2005).

2.3 Métodos matemáticos

Tanto para la interpretación de los datos experimentales obtenidos como para la determinación del modelo cinético recogido en la presente Memoria, se han empleado diferentes métodos y técnicas de cálculo que se van a presentar en este apartado.

Es de destacar que, todos los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo son de tipo integral, es decir, se trata de valores discretos de concentración de diversos componentes en función del tiempo experimental. Sin embargo, los métodos de cálculo empleados, dependiendo del objetivo buscado con los mismos, han sido tanto

métodos diferenciales como métodos integrales. En el presente apartado se describirán los métodos empleados en cada caso particular.

Asimismo, junto a los métodos de cálculo, ha sido necesario el empleo de técnicas de ajuste estadístico, que también serán descritos en el presente Apartado. Finalmente, tanto para la aplicación de los métodos matemáticos, como de los métodos de ajuste empleados en la presente memoria, se han utilizado diversos paquetes de software que serán comentados a lo largo de este Apartado.

2.3.1 MÉTODOS DE CÁLCULO

Es bien conocido que, dentro de la Ingeniería de la Reacción Química, existen diversos métodos de cálculo para la determinación de velocidades de reacción y de los parámetros que intervienen en las ecuaciones cinéticas que representan las citadas velocidades de reacción.

En el caso de trabajar con redes de reacciones, aumentan las posibilidades de métodos de cálculo a emplear. El método más conocido y, por ello, comúnmente empleado para llevar a cabo estas determinaciones es el conocido como **método de velocidades de producción** (García-Ochoa y col., 1990), que está basado en la ecuación [2.9], en la que las velocidades de producción de los j componentes presentes en la reacción se expresan en función de las ecuaciones cinéticas de las i reacciones implicadas en el esquema de reacción considerado, teniendo en cuenta el coeficiente estequiométrico que cada componente presenta en las citadas reacciones (v_{ij}).

$$R_j = \sum_{i=1}^{NC} v_{ij} \cdot r_j, (j=1 \dots NC) \quad [2.9]$$

Esta ecuación se puede escribir en forma matricial, considerando el vector de velocidades de producción (**R**) de los j componentes del sistema reaccionante, el vector de velocidades de reacción (**r**) que considera todas las reacciones que en el sistema se producen y, la matriz de los coeficientes estequiométricos (**v**), como se recoge en la ecuación [2.10]

$$\mathbf{R} = \mathbf{v} \mathbf{r} \quad [2.10]$$

Este método de cálculo puede aplicarse tanto en forma diferencial como integral, presentando menores errores si el método empleado es de tipo integral (García-Ochoa y col., 1989) La aplicación del método de velocidades de producción a una red de

reacciones presenta diversos problemas. En primer lugar, es necesario hacer suposiciones sobre la posible forma matemática de las diversas ecuaciones cinéticas que representan las velocidades de las i reacciones implicadas en la red de reacciones. En segundo lugar, el método de cálculo genera un sistema de ecuaciones que debe ser resuelto de forma simultánea a la determinación de los valores óptimos de los parámetros presentes en las ecuaciones cinéticas supuestas. La determinación del modelo cinético representativo de una red compleja de reacciones es, empleando el método de velocidades de producción, un problema en múltiple respuesta, que requiere el acoplamiento de algoritmos de cálculo y de ajuste, a la vez que se van probando combinaciones de las posibles ecuaciones cinéticas a emplear en cada una de las reacciones del esquema considerado.

Sería de gran utilidad poder separar estas etapas, es decir, poder discriminar primero cuál es la ecuación cinética adecuada para representar la velocidad de cada una de las reacciones presentes en el esquema y, posteriormente, determinar los valores óptimos de los parámetros cinéticos presentes en las ecuaciones finalmente elegidas.

En el caso de que la matriz de los coeficientes estequiométricos (\mathbf{v}) sea cuadrada, es posible calcular valores discretos de la velocidad de reacción de cada una de las ecuaciones implicadas en la red, teniendo en cuenta que se encuentran dentro de la misma, debido a que el vector de velocidades de reacción se puede despejar de la ecuación [2.11], de la forma:

$$\mathbf{r} = \mathbf{v}^{-1} \cdot \mathbf{R} \quad [2.11]$$

El método de cálculo que resulta de la aplicación de la ecuación [2.11] a una red de reacciones se denomina **método de velocidades de reacción** (García-Ochoa y col., 1990). Este método presenta la gran ventaja de que permite obtener valores discretos de la velocidad de las distintas reacciones presentes en la red. Una vez conocidos los citados valores, es posible determinar de forma aislada la ecuación cinética que mejor represente la evolución de cada una de las reacciones. Este método, al igual que el tradicional basado en las velocidades de producción de los j componentes presentes en el sistema de reacción, puede ser aplicado tanto en forma diferencial como en forma integral. Al igual que en el caso anterior, la aplicación de métodos integrales de cálculo siempre proporciona resultados con menores errores.

Por ello, en la presente Memoria, los métodos de cálculo se van a emplear, siempre que sea posible, en su forma integral, es decir, realizando la integración numérica de las ecuaciones diferenciales o sistemas de ecuaciones diferenciales planteados a partir del método de cálculo elegido para la determinación de ecuaciones cinéticas y/o valores óptimos de parámetros. Únicamente en el caso de la determinación de los valores de actividades enzimáticas (en el Apartado 4.2 del Capítulo 4. de la presente Memoria) se ha empleado el método diferencial de cálculo, ya que se trata de determinar el valor específico de la velocidad inicial para cada una de las reacciones de la ruta 4S a partir de valores discretos de evolución de la concentración del reactante correspondiente a la reacción, como se recoge en el citado Apartado.

Para la determinación del modelo cinético del proceso y la simulación con el mismo, en la presente Memoria se han empleado los dos métodos de cálculo previamente descritos. El método de velocidades de reacción se ha utilizado para la determinación de las ecuaciones cinéticas representativas de cada reacción de la ruta 4S, así como para la obtención de valores iniciales de los parámetros cinéticos presentes en las mismas. El método de velocidades de producción se ha empleado en la optimización de los valores de los parámetros de las ecuaciones cinéticas, así como en la simulación del proceso. El proceso de cálculo seguido se encuentra descrito con mayor profundidad en el Apartado 6.1 del Capítulo 6 del presente trabajo.

2.3.2 MÉTODOS DE AJUSTE

En cuanto a los métodos de ajuste empleados en la presente Memoria, todos ellos han sido de tipo no lineal, empleando para ello un algoritmo de cálculo que se detalla en el siguiente apartado y que presenta, como función objetivo, la minimización de la suma del cuadrado de los residuos (SCR), según la ecuación [2.12].

$$SCR = \sum_{j=1}^{NR} \frac{\sum_{i=1}^{Ndat} (C_j^{\text{exp}} - C_j^{\text{teo}})^2}{N} \longrightarrow \text{mínimo} \quad [2.12]$$

En función del método de cálculo empleado el método de ajuste se ha aplicado en simple respuesta (método de velocidades de reacción), ya que el planteamiento del método proporciona ecuaciones diferenciales aisladas para el estudio de cada una de las

reacciones implicadas en la ruta 4S; o en múltiple respuesta (método de velocidades de producción), debido a que el método de cálculo proporciona un sistema de ecuaciones diferenciales en el que las variables a ajustar (valores de las concentraciones de los componentes de la ruta 4S) se encuentran interrelacionadas.

La bondad del ajuste se determinó atendiendo a los siguientes parámetros estadísticos: F de *Fischer*, indicativo del grado global de ajuste; t de *Student*, indicativo del grado de significación de cada parámetro (relacionado con el intervalo de confianza de los parámetros: valores mínimo y máximo proporcionados por el algoritmo de regresión); y SRC o suma de residuos al cuadrado, recogido en la ecuación [2.12], indicativo de la calidad en la reproducción de los datos experimentales. La comprobación de la bondad del ajuste, en lo referente a los parámetros estadísticos comentados, se realiza a partir de la comparación con los valores de los mismos tabulados para el 95% de confianza, según el número de parámetros a calcular y el número de datos que se emplean en cada ajuste, es decir, el número de grados de libertad que existe en el ajuste que se realiza.

2.3.3 PROGRAMAS EMPLEADOS

Para la realización de los cálculos comentados previamente, en el presente trabajo se han empleado dos paquetes de software: Origin 7.5 y Aspen Custom Modeler®.

En el caso del paquete de software Origin 7.5, este programa se ha utilizado para llevar a cabo el ajuste de los parámetros de la expresión [4.1] sobre los datos experimentales de concentración de cada uno de los sustratos de las enzimas de la ruta 4S, para realizar la determinación de las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S mediante el método diferencial, según se describe en Apartado 2.2.2.3 del presente capítulo, y se particulariza en el Apartado 4.2 del Capítulo 4 de la presente Memoria.

En cuanto al paquete de software Aspen Custom Modeler®, se ha empleado tanto para la aplicación del método de velocidades de producción como del método de velocidades de reacción, siendo posible dentro de este software, elegir los algoritmos de cálculo para la realización de las determinaciones matemáticas necesarias. En lo referente al algoritmo de regresión no lineal, el denominado NL2SOL (Non-linear Least-Squares Solver) es el que se ha escogido para realizar los ajustes necesarios en

cada caso. Se trata de un programa que emplea la suma de residuos al cuadrado como criterio de optimización, con una variación del algoritmo del método de Newton. (Dennis y col., 1981) En cuanto al método numérico de integración, se ha empleado el método implícito de Euler con paso variable. Es una variación del método de Euler implícito (Gautschi, 1997), que goza de rapidez en la integración. Poder variar el tamaño de paso le permite mantener un control del error, menor gasto de recursos de cálculo en el ordenador y mayor precisión en los resultados.

3. ESTUDIO PRELIMINAR

3 ESTUDIO PRELIMINAR

A lo largo de la presente Memoria se va a estudiar la desulfuración de DBT en fase acuosa mediante el empleo de células de *Pseudomonas putida* CECT5279 empleando diferentes condiciones que constituyen distintas formas de operación. En este capítulo se propone una experimentación preliminar que sirve para apoyar el estudio que se presenta en los capítulos posteriores de esta Tesis Doctoral.

Para la determinación de un procedimiento óptimo de biodesulfuración de DBT con *Pseudomonas putida* CECT5279, en el presente capítulo se realiza una comparación preliminar entre las dos principales formas de operación que se encuentran en la literatura sobre este tipo de proceso: el empleo de células en crecimiento y el empleo de células en estado de *resting cells*. En el primer caso, el compuesto organosulfurado se emplea como fuente de azufre durante el crecimiento celular, y en el segundo, se lleva a cabo el proceso de desulfuración en dos etapas, en una primera, en que se obtiene el biocatalizador, y en una posterior, en ausencia de crecimiento microbiano, en que tiene lugar la biodesulfuración. Las características de cada una de estas posibilidades y su empleo en diversos trabajos sobre este proceso de biodesulfuración ya han sido revisadas en el Apartado 1.3.2 de la Introducción de la presente Memoria. Sin embargo, para centrar el trabajo realizado en este capítulo, se va a incorporar un breve resumen del empleo y características de estas dos formas de operación.

La desulfuración durante el crecimiento microbiano y la biodesulfuración en condiciones de reposo celular han sido propuestas como formas de operación en la literatura. La principal ventaja de desulfurar durante el crecimiento es el mantenimiento de la actividad de las células (Soleimani y col., 2007; Yang y col., 2007). Así, diferentes autores han recurrido a este sistema de desulfuración no sólo con *Pseudomonas putida* (Setti y col., 1994 y 1997), sino también empleando otros biocatalizadores como *Rhizobium meliloti* (Frassinetti y col., 1998), *Paenibacillus sp.* (Ishii y col., 2000b), *Corynebacterium sp.* (Maghsoudi y col., 2000), *Gordonia alkarivorans* (Li y col., 2006; Alves y col., 2007), *Rhodococcus gluberulus* (Yang y col., 2007) y *Mycobacterium sp.* (Chen y col., 2009).

Sin embargo, otros autores optan por trabajar en condiciones de *resting cells* porque las operaciones en crecimiento presentan varias desventajas: suelen ser más lentas, ofrecen menores rendimientos y se puede producir la inhibición del biocatalizador por el producto final de la ruta. También se presentan dificultades para que muchos microorganismos puedan crecer en sistemas bifásicos (Soleimani y col., 2007). Otros autores consideran que separar crecimiento y desulfuración permite una operación más eficiente (Ohshiro y col., 1996), sobre todo por la sencillez de la misma y por evitar interferencias y la presencia de otros metabolitos o subproductos (Konishi, y col., 1997). Pero uno de los principales factores que se cita en diversos trabajos a favor del empleo de células en reposo es la ventaja de poder emplear mayores concentraciones de biomasa (Le Borge y Quintero, 2003)

De esta manera, existen diferentes trabajos con *Pseudomonas putida* como biocatalizador en condiciones de reposo (Alcón y col., 2005; Caro y col., 2007; Alcón y col., 2008), *Rhodococcus erythropolis* (Abbad-Andaloussi y col. 2003), *Gordona alkanivoris* (Mohebbi y col., 2006; Shavandi y col., 2009), o *Mycobacterium phlei* (Furuya y col., 2001).

De cara a un posterior estudio más profundo, a lo largo de este capítulo, se muestra la interpretación de resultados de experimentos preliminares para comparar estas dos posibles formas de operación: la desulfuración durante el crecimiento y la desulfuración en condiciones de reposo o *resting cells*.

3.1 Criterios para la evaluación de las formas de operación

La bondad de una operación de biodesulfuración de DBT está ligada a conseguir la mayor transformación de DBT en el compuesto libre de azufre, HBP, en el menor tiempo posible y con el empleo de la menor cantidad de biomasa necesaria.

Para evaluar los resultados obtenidos en este estudio, durante el crecimiento celular o empleando células en reposo, se van a utilizar los parámetros que se enumeran a continuación.

- **Grado de desulfuración**

Este parámetro refleja la capacidad desulfurante que manifiestan las células bajo las condiciones en que se realiza el experimento de desulfuración durante el crecimiento o en condiciones de reposo celular. Relaciona la concentración alcanzada en el compuesto final de la ruta, HBP, a un tiempo dado, t , y la concentración inicial de sustrato azufrado de partida, DBT, de la manera en que se refleja en la expresión [3.1].

$$X^t_{BDS} = \frac{C^t_{HBP}}{C^0_{DBT}} \cdot 100 \quad [3.1]$$

- **Tiempo necesario para alcanzar el grado de desulfuración máximo**

Se trata simplemente del tiempo necesario para alcanzar la máxima conversión de DBT en HBP dentro del tiempo de operación de cada modalidad de desulfuración propuesta. Se ha representado por $t^{X^{max}_{BDS}}_C$ ó por $t^{X^{max}_{BDS}}$, según se trabaje, respectivamente, en condiciones de crecimiento o de células en reposo.

- **Velocidad inicial de eliminación de DBT**

Se ha empleado el método diferencial, tal como se explica en el Capítulo 2, para estimar la velocidad inicial de eliminación de DBT a partir de datos de concentración de DBT frente al tiempo, considerando los primeros puntos de esta evolución. Este parámetro, R_{DBT}^0 , se ha estimado según la expresión [3.2].

$$R_{DBT}^0 = - \left. \frac{dC_{DBT}}{dt} \right|_{t=0} \quad [3.2]$$

- **Concentración de biomasa empleada**

La concentración de biomasa empleada, C_X , es un valor único y constante en el caso de operar en condiciones de *resting cells*. Sin embargo, durante el crecimiento, existe, lógicamente, una evolución de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo. En estos casos, se ha decidido estimar la concentración media de biomasa empleada como se expresa en la ecuación [3.3].

$$C_X^m = \frac{\int_0^{t^{X^{max}_{BDS}}_C} C_X(t) \cdot dt}{\int_0^{t^{X^{max}_{BDS}}_C} dt} \quad [3.3]$$

Este valor medio se ha calculado mediante integración numérica, utilizando el software Microcal Origin® 7.5, a partir los datos de evolución de concentración de biomasa con el tiempo en cada experimento realizado en crecimiento.

3.2 Biodesulfuración durante el crecimiento

En este apartado, se reúnen y se discuten los resultados obtenidos en la desulfuración de DBT en fase acuosa durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279. En este estudio, se han llevado a cabo experimentos en fermentador poniendo en contacto las células de *Pseudomonas putida* CECT5279 con DBT, empleado como fuente de azufre.

En los experimentos llevados a cabo para la realización de este estudio sobre la biodesulfuración en crecimiento, la variable estudiada es la concentración empleada de DBT. Por otro lado, como experimento control se ha escogido el crecimiento realizado con sulfato magnésico como fuente de azufre, por ser el sustrato azufrado que se emplea durante el crecimiento para obtener células según un protocolo estandarizado para maximizar la producción de biomasa y la capacidad desulfurante (Martín y col., 2004 y 2005), descrito en el Apartado 2.2.2.1 de esta Memoria. Esta experimentación se ha llevado a cabo en un biorreactor tanque agitado de 2 L de volumen útil, siguiendo el protocolo experimental ya mencionado recogido en dicho Apartado 2.2.2.1.

3.2.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES

En la Tabla 3.1 se muestra la planificación experimental para este estudio, y en las Tablas 3.2 a 3.4, los resultados obtenidos a partir de experimentos de desulfuración de DBT en fase acuosa durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279.

TABLA 3.1 - Diseño experimental para un estudio de desulfuración durante el crecimiento del biocatalizador.

Código	Sustrato azufrado	Concentración
		(μM)
C-1	MgSO ₄	1800
C-2	DBT	25
C-3	DBT	100

El experimento codificado como C-1, en la Tabla 3.1, corresponde al experimento control, es decir, en él se emplea como fuente de azufre sulfato de magnesio, siguiendo el protocolo experimental de crecimiento descrito en el Apartado 2.2.2.1 de esta Memoria. Durante este experimento, no se produce desulfuración en sí, ya que no hay presente ningún compuesto a desulfurar, pero se generan en el interior celular las enzimas necesarias para el correcto funcionamiento de la ruta 4S. Los resultados de este crecimiento sirven de referencia para comparar la evolución de la biomasa a lo largo del tiempo con la de los experimentos codificados como C-2 y C-3, en que se utiliza dibenzotiofeno como sustrato azufrado en dos concentraciones iniciales diferentes: 25 y 100 μM .

A continuación, en la Tabla 3.2, se muestra la evolución de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo para los tres experimentos que se muestran en la planificación experimental de la Tabla 3.1. La evolución de los compuestos de la ruta 4S partiendo de DBT 25 y 100 μM , aparece en las Tablas 3.3 y 3.4, respectivamente.

Las muestras recogidas a lo largo de la experimentación se analizaron mediante HPLC, como se describe en el Apartado 2.2.1.4 del Capítulo 2 de la presente Memoria, para conocer la evolución de la concentración de compuestos que participan de la ruta 4S a lo largo del tiempo. Para ello, se recogen muestras del caldo de crecimiento a diferentes tiempos, tomando alícuotas de 0,5 mL. En cada experimento, se tomó una muestra antes de inocular el fermentador; que se considera como muestra inicial. Cada una de estas alícuotas se recoge en un tubo *Eppendorf* preparado con 0,5 mL de acetonitrilo. El análisis de las muestras se realiza median cromatografía de HPLC, según la metodología que se describe en el Apartado 2.2.1.4, para obtener los valores de concentración de los compuestos de la ruta 4S a cada tiempo de muestreo.

TABLA 3.2 - Evolución de la concentración de biomasa durante los experimentos C-1, C-2 y C-3.

C-1		C-2		C-3	
t _c	C _x	t _c	C _x	t _c	C _x
(h)	(g peso seco/L)	(h)	(g peso seco/L)	(h)	(g peso seco/L)
0,0	0,127	0,0	0,100	0,0	0,140
1,0	0,196	1,0	0,191	1,0	0,202
3,0	0,480	2,3	0,461	2,0	0,269
5,0	0,662	4,3	0,882	3,0	0,354
7,0	0,866	5,5	1,076	4,0	0,501
9,0	1,155	6,5	1,257	5,0	0,577
11,0	1,334	8,0	1,568	7,0	0,701
12,5	1,550	12,0	1,988	9,0	1,033
14,0	1,760	15,0	2,213	12,0	1,222
17,0	1,990	18,0	2,531	16,0	1,715
20,0	2,240	20,0	2,639	18,0	1,894
23,0	2,508	22,0	2,811	19,0	1,900
25,0	2,750	24,0	2,854	20,0	2,080
27,5	2,832	26,5	2,891	22,0	2,170
30,0	3,060	29,0	2,850	24,0	2,390
33,0	3,355	32,0	2,811	26,0	2,570
36,0	3,533	35,0	2,765	27,0	2,696
39,0	3,629	38,0	2,565	30,0	2,877
42,0	3,773	40,0	2,453	33,0	2,925
46,3	3,854	43,8	2,315	36,0	2,976
49,0	3,950			39,0	3,001
51,0	3,951			42,5	3,121
52,0	4,000			45,5	2,981
54,0	3,951			48,0	3,063
58,0	3,880				
60,0	3,601				

TABLA 3.3 - Evolución de los compuestos de la ruta 4S a lo largo del crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 en el experimento C-2.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(h)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0,0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,0	0,70	9,66	8,09	2,00	1,70
2,3	0,00	8,53	5,78	6,27	4,41
4,3	0,00	2,00	0,00	11,02	11,98
5,5	0,00	0,00	0,00	6,02	18,98
6,5	0,00	0,00	0,00	2,60	22,40
8,0	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
12,0	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
20,0	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
22,0	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
26,5	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
29,0	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
43,8	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 3.4 - Evolución de los compuestos de la ruta 4S a lo largo del crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 en el experimento C-3.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(h)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0,0	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,0	52,40	17,54	3,91	5,64	0,51
2,0	30,11	42,34	18,14	5,29	2,58
3,0	18,12	27,44	32,40	15,70	6,33
4,0	11,17	10,00	47,91	20,13	10,79
5,0	2,23	0,00	41,89	45,29	10,59
8,0	0,00	0,00	20,00	50,00	30,00
12,0	0,00	0,00	10,00	30,00	60,00
16,0	0,00	0,00	2,00	8,00	90,00
18,0	0,00	0,00	0,00	1,01	98,99
19,0	0,00	0,00	0,00	1,83	98,17
20,0	0,00	0,00	0,00	0,29	99,71
22,0	0,00	0,00	0,00	1,00	99,00
24,0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
26,0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
27,0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
42,5	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
45,5	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
48,0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00

3.2.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El problema principal de esta forma de operar para la eliminación de compuestos organosulfurados, es que simultáneamente deben tener lugar los fenómenos metabólicos que permiten la adaptación al medio, el crecimiento, y la supervivencia de *Pseudomonas putida* CECT5279, y la eliminación del compuesto azufrado. Los nutrientes del medio, cofactores y poder reductor disponibles, deben emplearse no sólo para realizar las diferentes funciones celulares, sino también para eliminar el DBT presente en el medio. El objetivo de este capítulo es estudiar la viabilidad de esta forma de operar para eliminar DBT.

3.2.2.1 Influencia de la biodesulfuración en el crecimiento del microorganismo

Estudios anteriores en el grupo de investigación FQPIMA han llevado a la optimización del medio de crecimiento y de las condiciones de obtención del biocatalizador a fin de maximizar la cantidad de biomasa producida y su capacidad desulfurante (Martín y col., 2004 y 2005). En estos trabajos, la evaluación de la capacidad desulfurante de las células se realizó trabajando en *resting cells* con células recogidas a diferentes tiempos seleccionados a lo largo del crecimiento. En este caso, en los experimentos realizados para este estudio, se ha seguido el mismo protocolo para llevar a cabo las fases de preinóculo y, inóculo en el apartado 2.2.2.1, y se han realizado crecimientos de *Pseudomonas putida* CECT5279 empleando DBT como fuente de azufre, en vez de sulfato magnésico, para evaluar su capacidad desulfurante.

A fin de comparar la influencia del fenómeno de desulfuración en el crecimiento simultáneo de *Pseudomonas putida* CECT5279, se ha empleado un modelo cinético empírico basado en la ecuación logística propuesta por Pierre Françoise Verhulst en 1838 (Verhulst, 1838 y 1845) y posteriormente popularizada por Raymon Pearl y Lowell L. Reed (Pearl y Reel, 1920). Esta ecuación se ha aplicado a diferentes sistemas microbianos (Weiss y Ollis, 1980; Bailey y Ollis, 1983; Pinches y Pallent, 1986; Vázquez y Murado, 2008).

Este modelo se desarrolla a partir de una ecuación que procede de la que desarrollaron Pear y Reel (Pearl y Reel, 1920) y se presenta como expresión [3.4], considerando que el sustrato limitante para el crecimiento microbiano es la fuente de azufre, denominada como “S”.

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \cdot C_S \quad [3.4]$$

La velocidad de eliminación del sustrato se puede escribir como:

$$\frac{dC_S}{dt} = -Y_{XS} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad [3.5]$$

Integrando la expresión [3.5] bajo las condiciones de contorno $t=0 \therefore C_X = C_X^0$, y despejando la concentración de la fuente de azufre, C_S , se tiene que:

$$C_S = C_S^0 - Y_{XS} \cdot (C_X - C_X^0) \quad [3.6]$$

Si “S” es el sustrato limitante para el crecimiento, se cumple que para $C_S = 0 \therefore C_X = C_X^{máx}$, y de esta manera, se cumple la expresión siguiente:

$$C_S^0 = Y_{XS} \cdot (C_X^{máx} - C_X^0) \quad [3.7]$$

De las ecuaciones [3.6] y [3.7] se deduce la expresión [3.8] que se muestra a continuación:

$$\frac{C_S}{C_S^0} = \frac{C_X^{máx} - C_X}{C_X^{máx} - C_X^0} \quad [3.8]$$

Substituyendo la expresión [3.8] en la ecuación [3.4], bajo las consideraciones $\mu = \mu \cdot C_S^0$ y $C_X^{máx} \gg C_X^0$ se obtiene la expresión [3.9].

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{máx}}\right) \quad [3.9]$$

Integrando la expresión [3.9] bajo las condiciones $t=0 \therefore C_X = C_X^0$ se obtiene:

$$C_X = \frac{C_X^0 \cdot \exp(\mu t)}{1 - \left[\left(\frac{C_X^0}{C_X^{máx}}\right) \cdot (1 - \exp(\mu t))\right]} \quad [3.10]$$

De esta manera, se tiene un modelo cinético de crecimiento con dos parámetros. El primero, μ , es la velocidad específica de crecimiento, y el segundo, $C_X^{máx}$, es la concentración máxima de biomasa; μ está relacionado con el tiempo de duplicación celular, dadas unas condiciones de cultivo, y $C_X^{máx}$, representa la máxima concentración que se alcanza en la fase estacionaria de crecimiento en dichas condiciones de cultivo.

En la Figura 3.1 se muestra la evolución de la concentración de biomasa a lo largo de los tres experimentos C-1, C-2 y C-3, que se presentan en la Tabla 3.1. El primero de ellos corresponde a las condiciones estandarizadas de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 utilizando sulfato magnésico como fuente de azufre, mientras que los otros dos experimentos se han realizado empleando DBT como sustrato azufrado en dos concentraciones (25 y 100 μM , respectivamente).

En la tabla 3.5 se reflejan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos al emplear la función logística en el ajuste de estos datos. A la vista de estos resultados, el proceso de la desulfuración y el fenómeno del crecimiento microbiano no son independientes. Aunque la presencia de DBT permite velocidades específicas de crecimiento mayores que el sulfato de magnesio, La concentración máxima de biomasa que se alcanza es menor al emplear DBT que al utilizar sulfato como fuente azufrada. La operación de biodesulfuración acelera la duplicación celular, pero a la vez limita el crecimiento máximo, y la fase de muerte se adelanta en el tiempo a la vista de la evolución de los datos reflejada en la Figura 3.1.

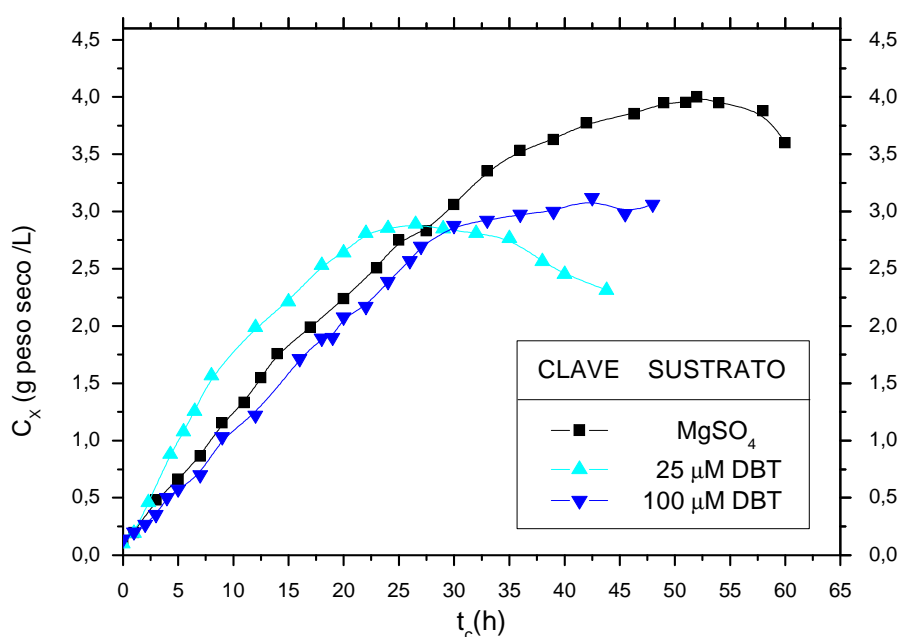


FIGURA 3.1 - Curvas de crecimiento correspondientes a los experimentos C-1, C-2 y C-3.

TABLA 3.5 - Parámetros cinéticos relacionados con el crecimiento obtenidos para los experimentos C-1, C-2 y C-3.

Experimento	μ	$C_x^{\text{máx}}$
	(h ⁻¹)	(g peso seco/L)
C-1	0,195 ± 0,018	3,950 ± 0,055
C-2	0,413 ± 0,029	2,751 ± 0,086
C-3	0,217 ± 0,015	2,964 ± 0,145

3.2.2.2 Eficiencia del sistema de operación

Como ya se ha indicado, el interés de este estudio preliminar radica en la evaluación de esta forma de operar desde el punto de vista de la conversión de DBT lograda y el menor empleo posible de tiempo y biomasa. En las Figuras 3.2 y 3.3 se muestra la evolución de los compuestos implicados en la ruta 4S durante dos experimentos de desulfuración empleando células en crecimiento, y concentraciones iniciales de DBT de 25 y 100 μM , respectivamente. Se observan diferencias en cuanto a la velocidad del proceso al emplear una u otra concentración inicial de DBT, siendo más lenta la operación cuando la concentración inicial de DBT es mayor.

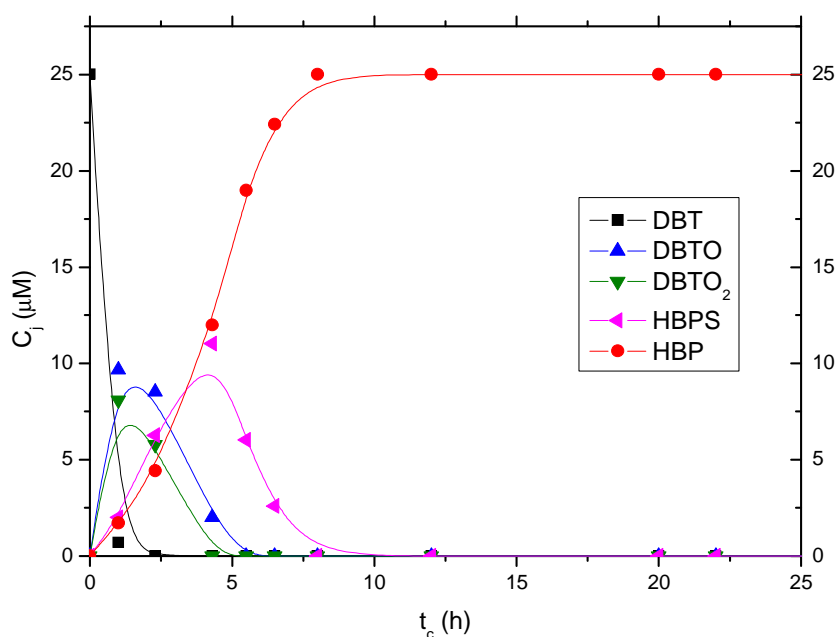


FIGURA 3.2 - Evolución de los compuestos de la ruta 4S mediante desulfuración en crecimiento partiendo de DBT 25 μM .

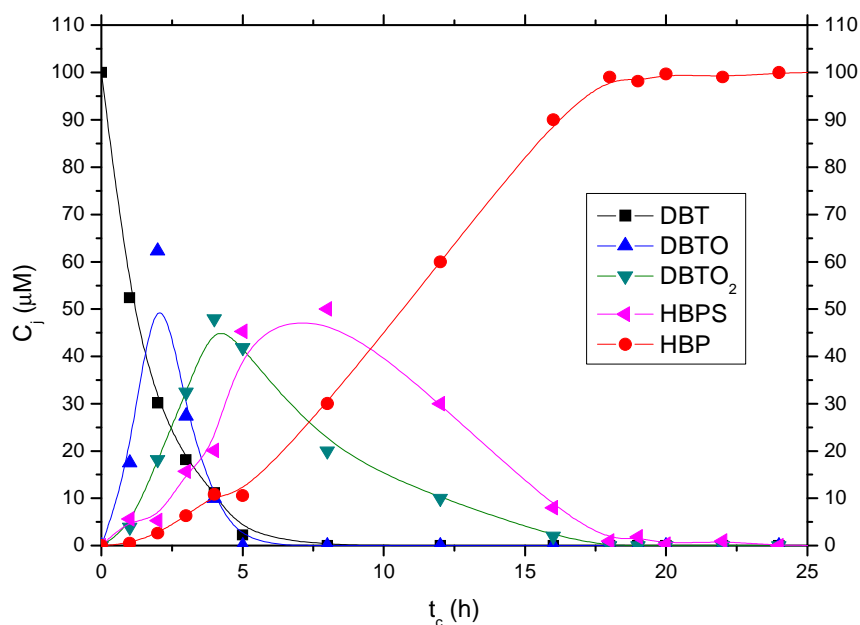


FIGURA 3.3 - Evolución de los compuestos de la ruta 4S mediante desulfuración en crecimiento partiendo de DBT 100 μM .

En la Tabla 3.6 se muestran los valores de los parámetros obtenidos para los experimentos con concentraciones iniciales de DBT de 25 y 100 μM . Aunque en ambos casos la transformación de DBT en el compuesto libre de azufre, HBP, es total, el tiempo necesario y el aprovechamiento de la biomasa presente son diferentes según la concentración inicial de sustrato azufrado utilizada.

El tiempo necesario para eliminar y transformar completamente una concentración inicial de DBT 25 μM fue de 8 h, mientras que fueron necesarias 24 h para lograr la desulfuración completa de DBT presente en una concentración inicial de 100 μM . Por otro lado, la velocidad inicial de desaparición de DBT fue ligeramente superior en el experimento al partir de una menor cantidad de sustrato azufrado. De esta manera, se pone de manifiesto una deceleración en la capacidad de la biomasa presente para transformar el sustrato azufrado. Además, se observa un efecto negativo del aumento de la concentración inicial de DBT en la desulfuración durante el crecimiento. Asimismo, al emplear una mayor concentración inicial de este sustrato, se prolonga también en el tiempo del experimento la acumulación de intermedios de la ruta 4S, DBTO, DBTO₂ y HBPS como se observa en las Figuras 3.2 y 3.3.

TABLA 3.6- Parámetros calculados a partir de los datos de los experimentos de desulfuración durante el crecimiento partiendo de DBT 25 y 100 μM .

C_{DBT}^0	X_{BDS}^{max}	$t_c^{X_{BDS}^{max}}$	R_{DBT}^0	Y_{XS}
(μM)	(%)	(h)	($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).	($\mu\text{mol/g}$)
25	100	8	1,497	17,03
100	100	24	1,015	44,44

Durante el crecimiento se consiguen conversiones del 100% y velocidades iniciales de eliminación de DBT elevadas con una inversión moderada de biomasa. Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar la máxima conversión es bastante alto. En la Tabla 3.6 se muestran además los rendimientos biomasa-sustrato azufrado; siendo de 17,03 y 44,44 μmol DBT/g en peso seco de biomasa, respectivamente. En general, los crecimientos han requerido tiempos elevados para alcanzar valores del grado de desulfuración aceptables. Así, para llegar a un 80% de conversión fueron necesarias aproximadamente 7 h en el caso de partir de DBT 25 mM, y algo más de 15 h en el caso de una concentración inicial de DBT de 100 μM .

A la vista de los resultados obtenidos, crecimiento y desulfuración no son independientes. La presencia de un compuesto organosulfurado como el DBT afecta al crecimiento del microorganismo. Los recursos celulares deben invertirse en una operación adicional, que consiste en poner en funcionamiento la ruta 4S, y la producción de biomasa se reduce en comparación con una operación de fermentación para producir biocatalizador sin desulfurar DBT. La cantidad de sustrato azufrado presente inicialmente afecta a la cantidad de células disponibles en el medio de crecimiento para llevar a cabo la operación de desulfuración. El paso de una concentración inicial de DBT de 25 μM a 100 μM dio como resultado una disminución de la velocidad específica de crecimiento, μ . Sin embargo, su valor no fue cuatro veces menor, sino sólo aproximadamente la mitad del obtenido a 25 μM . La concentración de biomasa máxima alcanzada apenas se vio afectada por el aumento de la concentración del sustrato azufrado.

Desde el punto de vista de la desulfuración de DBT, aumentar cuatro veces la concentración inicial de sustrato azufrado redujo el valor de la velocidad inicial de desaparición de DBT a la mitad de su valor al reducir cuatro veces la concentración inicial. El rendimiento biomasa-sustrato azufrado, sufrió un aumento considerable al

cuadruplicar la concentración inicial de DBT; paso de ser 17,03 a 44,44 mmol HBP /g peso seco. La reducción de la velocidad inicial de eliminación y de la tasa específica de crecimiento, tienen el efecto negativo de aumentar considerablemente el tiempo de operación, reduciendo la relación entre la cantidad de sustrato azufrado y la cantidad de biomasa disponible.

En los apartados siguientes de esta Memoria, se muestran los estudios de desulfuración de DBT en fase acuosa empleando células sin crecimiento. Se va a comparar los resultados obtenidos para conocer si alguna forma de operación para desulfurar dibenzotiofeno en condiciones de *resting cells* presenta mayor eficacia que la desulfuración durante el crecimiento, reduciendo el tiempo de operación y el aprovechamiento de las células microbianas.

3.3 Biodesulfuración en condiciones de *resting cells*

En este apartado se recogen y se estudian los resultados del grupo de experimentos llevados a cabo para estudiar la desulfuración de DBT en condiciones de *resting cells*, impidiendo la duplicación celular.

Para este estudio se han obtenido células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de cinco tiempos de crecimiento. A fin de obtener resultados reproducibles, se siguió un protocolo estandarizado para el crecimiento del microorganismo (Martín y col., 2004 y 2005) y la obtención de muestras de biomasa para los posteriores ensayos de desulfuración. Se ha empleado la metodología que se describe en el Apartado 2.2.2.1 de la presente Memoria para obtener, a partir de un crecimiento en fermentador de 2 L, células de 5, 9, 23, 30 y 46 h de edad. Las muestras obtenidas se procesaron y conservaron tal y como se detalla en dicho capítulo antes de llevar a cabo ensayos de desulfuración en *resting cells* para estudiar la capacidad desulfurante de estas células. Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo que se describe en el Apartado 2.2.2.2. La concentración inicial de DBT fue 10 μ M y se empleó una concentración de biomasa en los ensayos de desulfuración de 0,7 g peso seco/L. Se tomaron muestras del medio de reacción a lo largo del tiempo de ensayo y se trataron y analizaron siguiendo la metodología que se describe en el Apartado 2.2.2.1 del Capítulo 2 de la presente Memoria. Como resultado se recopilan a continuación los resultados obtenidos a partir de estas medidas.

3.3.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES

En los experimentos llevados a cabo para estudiar la desulfuración de DBT en condiciones de *resting cells* se han empleado cinco tiempos de crecimiento: 5, 9, 23, 30 y 46 h, como se muestra en la planificación experimental que se presenta en la Tabla 3.7. La evolución de los compuestos DBT y HBP a lo largo de tiempo de ensayo de cada experimento se muestra en las Tablas 3.8 a 3.10.

TABLA 3.7- Diseño experimental para un estudio preliminar de desulfuración de DBT con células en estado de *resting cells*.

Código	Edad celular
	(h)
P-1	5
P-2	9
P-3	23
P-4	20
P-5	46

TABLA 3.8 - Resultados obtenidos de la evolución de DBT y HBP en los experimentos P-1 y P-2.

t_{BDS}	Experimento P-1		Experimento P-2	
	C_{DBT}	C_{HBP}	C_{DBT}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	10,0	0,0	10,0	0,0
5	6,1	0,0	6,5	1,7
10	4,0	1,4	4,0	4,5
15	2,3	1,7	1,7	5,0
20	2,0	2,5	0,9	5,5
25	1,0	2,7	0,3	6,7
30	0,4	3,2	0,0	7,1
60	0,0	4,6	0,0	8,0
90	0,0	5,8	0,0	8,4
120	0,0	7,0	0,0	8,4

TABLA 3.9 - Resultados obtenidos de la evolución de DBT y HBP en los experimentos P-3 y P-4.

t_{BDS} (min)	Experimento P-3		Experimento P-4	
	C_{DBT} (μM)	C_{HBP} (μM)	C_{DBT} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	10,0	0,0	10,0	0,0
5	5,1	2,1	5,3	2,7
10	2,5	2,3	3,0	3,5
15	2,1	2,9	2,0	3,7
20	1,0	3,5	1,0	4,2
25	0,8	4,0	0,9	4,5
30	0,4	4,2	0,2	4,9
60	0,0	4,8	0,0	5,3
90	0,0	5,2	0,0	5,7
120	0,0	5,8	0,0	6,0

TABLA 3.10 - Resultados obtenidos de la evolución de DBT y HBP en el experimento P-5.

t_{BDS} (min)	C_{DBT} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	10,0	0,0
5	7,0	0,0
10	4,5	0,0
15	3,2	0,0
20	2,6	0,0
25	1,4	0,0
30	1,0	0,0
60	0,1	0,0
90	0,0	2,0
120	0,0	4,7

3.3.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En este apartado se va a mostrar la interpretación de los resultados obtenidos al emplear células tomadas de un crecimiento en fermentador en medio BSM con sulfato magnésico a 5, 9, 23, 30 y 46 de tiempo de crecimiento, para desulfurar DBT en condiciones de *resting cells*.

En las Figuras 3.5 a 3.9 se muestra la evolución del sustrato azufrado, DBT y del compuesto final de la ruta 4S, HBP, en los experimentos realizados con cada una de las cinco edades celulares seleccionadas.

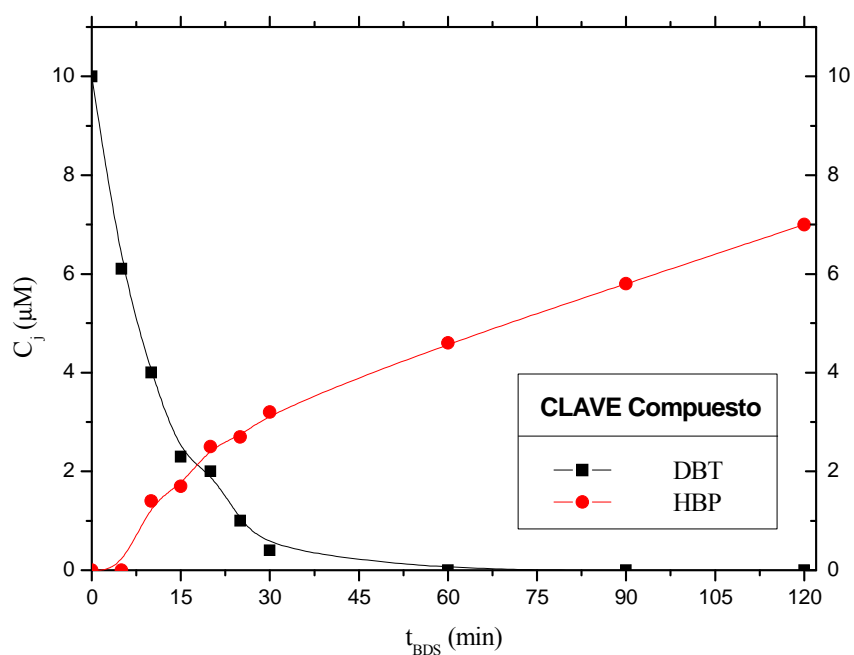


FIGURA 3.4 - Evolución de la concentración de DBT y HBP operando con células de 5 h de tiempo de crecimiento en condiciones de *resting cells*.

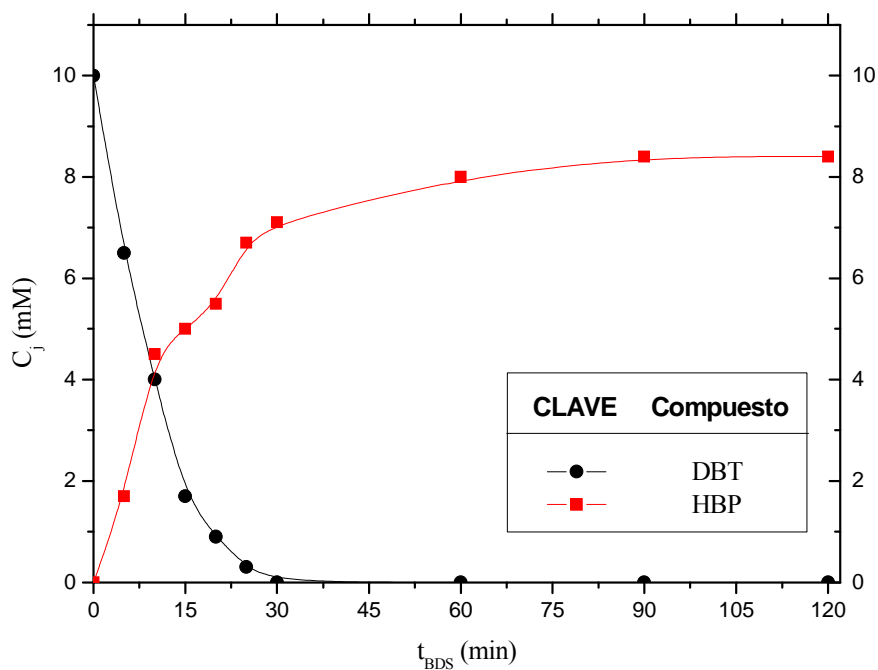


FIGURA 3.5 - Evolución de DBT y HBP operando con células de 9 h de tiempo de crecimiento en condiciones de *resting cells*.

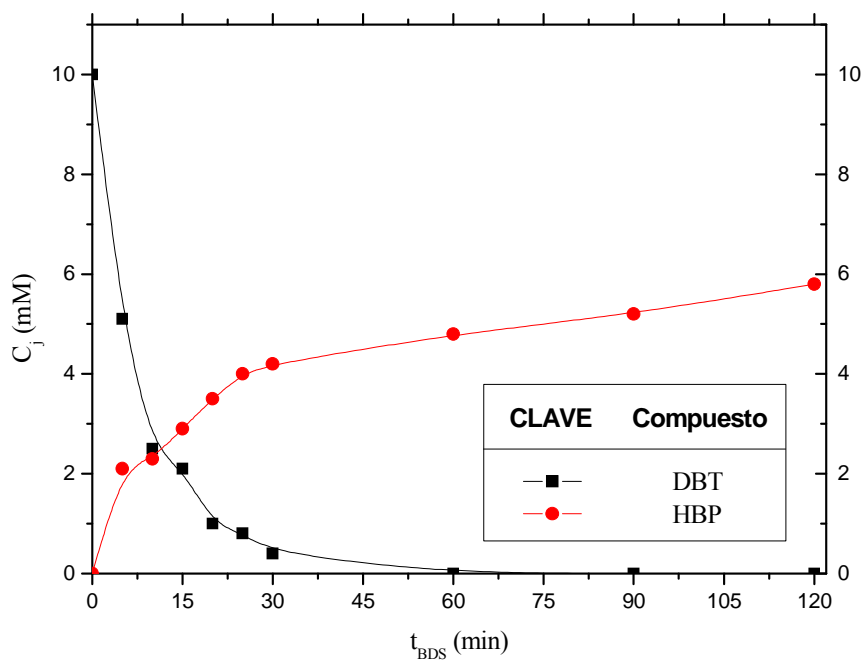


FIGURA 3.6- Evolución de la concentración de DBT y HBP operando con células de 23 h de tiempo de crecimiento en condiciones de *resting cells*.

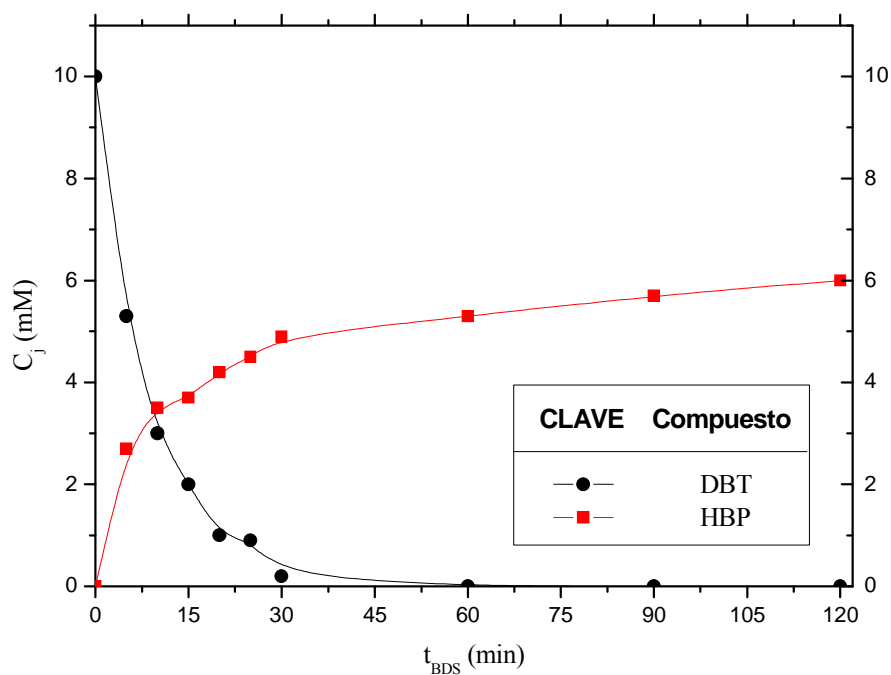


FIGURA 3.7 - Evolución de la concentración de DBT y HBP operando con células de 30 h de tiempo de crecimiento en condiciones de *resting cells*.

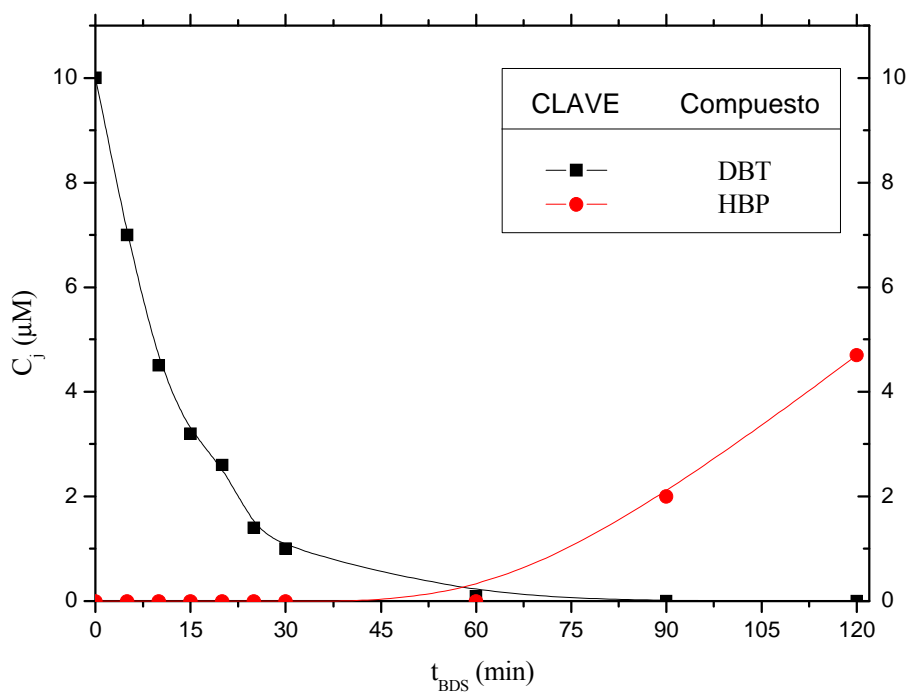


FIGURA 3.8 - Evolución de la concentración de DBT y HBP operando con células de 46 h en condiciones de *resting cells*.

A la vista de los resultados que se muestran en las Figuras 3.4 a 3.8, la evolución de desaparición de DBT no sigue una tendencia constante a lo largo del tiempo de crecimiento. La caída de la curva de concentración de dibenzotiofeno frente al tiempo de *resting* se va haciendo más pronunciada al aumentar la edad celular empleada de 5 a 23 h, como se observa en las Figuras 3.4 a 3.6. Sin embargo, el empleo de células de 30 y 46 horas no logra acelerar la desaparición de DBT en el medio,

En la figura 3.9 se representa esta situación, comparando a la vez la evolución de la concentración de DBT para los experimentos con las cinco edades celulares. Se han representado los datos experimentales hasta los 45 minutos de tiempo de ensayo para facilitar esta comparación. Se ve una eliminación más rápida del sustrato de partida al conforme se utilizan células de 5, 9 y 23 h de tiempo de crecimiento, y una ralentización de esta eliminación al emplear células de 30 y 46 h.

En la figura 3.10 se recoge la evolución de la concentración del compuesto final de la ruta 4S para las edades probadas en este estudio. La velocidad de producción de HBP aumenta al pasar de una concentración de biomasa de 5 a 9 h de tiempo de crecimiento. Sin embargo, el empleo de células de 23, 30 y 46 h no logra mayores conversiones de DBT en HBP.

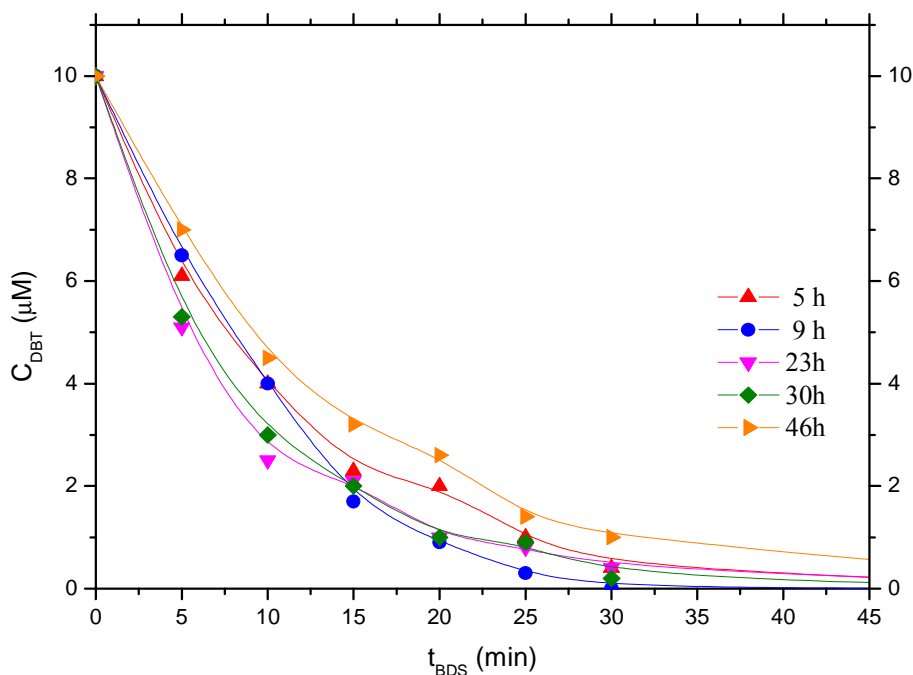


FIGURA 3.9 Evolución de la concentración de DBT empleando células de 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento en condiciones de *resting cells*.

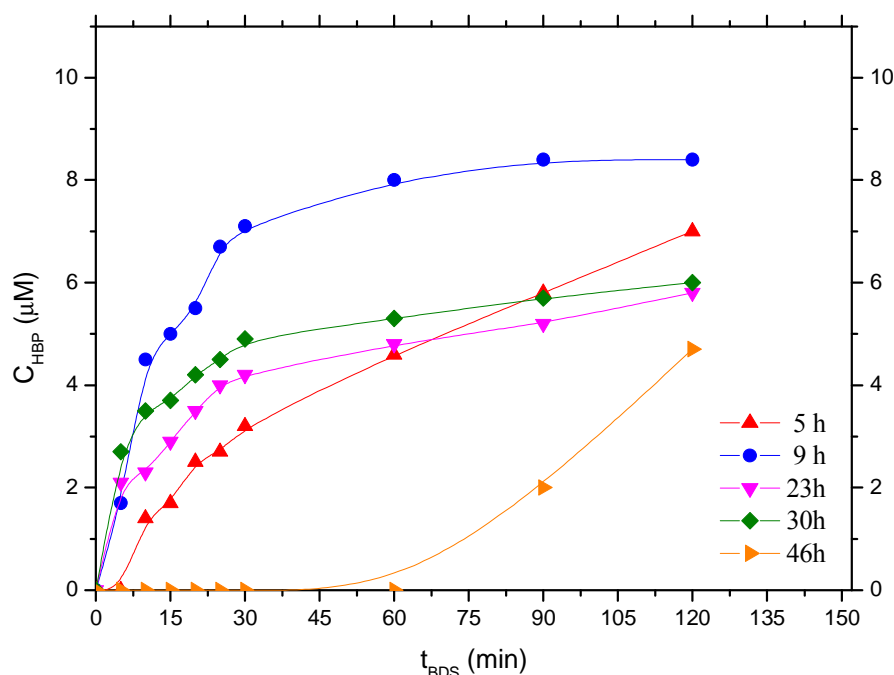


FIGURA 3.10 - Evolución de la concentración de HBP empleando células de 5, 9, 23, 30 y 46 h en condiciones de *resting cells*.

En la Tabla 3.11 se recopilan los parámetros calculados para cada uno de los experimentos en *resting cells* con edades celulares de 5, 9, 23, 30 y 46 h. de acuerdo con los resultados comentados anteriormente, la máxima capacidad desulfurante se manifiesta al utilizar células de 9 h de tiempo de crecimiento, mientras que la mayor velocidad de eliminación de DBT se presenta al emplear células de 23 h.

Aunque en ningún caso la conversión de DBT fue total, puesto que estos experimentos preliminares se limitaron a 2 h, se alcanzan valores bastante aceptables, sobre todo empleando células de 9 h de tiempo de crecimiento.

TABLA 3.11 - Parámetros calculados para la evaluación de la desulfuración de DBT en condiciones de *resting cells* con células de 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

t_c	X_{BDS}^{max}	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$	R_{DBT}^0
(h)	(%)	(min)	(μmol/L·min).
5	70	120	0,931
9	84	90	1,018
23	58	120	1,275
30	60	120	1,185
46	47	120	0,750

A la vista de los resultados obtenidos, se detecta una edad celular, 9 h, a la que se presenta la mayor capacidad desulfurante a lo largo del tiempo de crecimiento. Sin embargo, la evolución de la concentración de DBT a lo largo de la edad celular, parece seguir otro patrón diferente y su desaparición es más rápida al utilizar células que se han recogido del fermentador alrededor de las 23 h de crecimiento. Esta situación tan particular a lo largo de la fase exponencial de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, ha llevado a realizar un estudio de las actividades enzimáticas de la ruta 4S a lo largo del tiempo de crecimiento del biocatalizador, que se aborda en el Capítulo 4. Como se explica en esta parte de la Memoria, el objetivo de este estudio es conocer y justificar desde el punto de vista enzimático este comportamiento, para avanzar en el conocimiento de esta forma de operación con células en reposo.

Al comparar los parámetros que se han obtenido en las Tablas 3.6 y 3.11 para estos estudios previos de biodesulfuración durante el crecimiento y en condiciones de reposo, respectivamente, parece que tanto las conversiones alcanzadas, como la velocidad de eliminación de sustrato de partida son superiores en el caso de la eliminación de DBT durante el crecimiento. Sin embargo, los elevados tiempos de operación que ha sido necesario emplear para alcanzar conversiones elevadas en el crecimiento hacen pensar en un peor aprovechamiento de la biomasa puesta en juego. Separar fenómenos de crecimiento y desulfuración trabajando en condiciones de *resting cells* parece más eficiente de cara a un proceso de biodesulfuración (Ohshiro y col., 1996; Reichmuth y col., 2000), además de permitir procesos más rápidos y libres de problemas de inhibición (Soleimani y col., 2007).

Por estos motivos, en los capítulos siguientes de esta Memoria se trabaja en condiciones de reposo celular. Después de proponer diferentes formas de operación para la eliminación de DBT en fase acuosa, se comparan cada una de las formas de operación, incluida la desulfuración durante el crecimiento.

4. ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS INTRACELULARES DE LA RUTA 4S

4 ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS INTRACELULARES DE LA RUTA 4S

El estudio que se recoge en este capítulo surge a raíz de los resultados obtenidos en el estudio preliminar que se presenta en el Capítulo 3 de esta Memoria. Este trabajo previo consistió en estudiar la desulfuración de DBT empleando células de *Pseudomonas putida* CECT5279 bien durante el crecimiento, bien en condiciones de *resting cells* a partir de células obtenidas en distinta fase de crecimiento. En particular, los trabajos realizados con células en reposo a lo largo del tiempo de crecimiento, reflejan cambios en la capacidad desulfurante de *P. putida* al emplear distintas edades celulares. Sorprende que el empleo de células de una edad de crecimiento tan baja como 9 horas, sea la que permita la mayor transformación de DBT en HBP. Este hecho observado a nivel macroscópico es el punto de partida para tratar de estudiar la fenomenología de la biodesulfuración de DBT con células de *Pseudomonas putida* CECT5279 a un nivel más profundo, buscando una explicación científica a una escala que puede denominarse como microscópica en comparación con las conclusiones macroscópicas comentadas previamente.

La hipótesis de partida para tratar de explicar la evolución de la capacidad desulfurante a nivel macroscópico sería la existencia de una variación, a lo largo del tiempo de crecimiento, de la actividad de las enzimas DszA, B y C en el biocatalizador, esto es, las proteínas que catalizan las etapas de la ruta metabólica 4S. Por este motivo, se propone abordar experimentalmente, la medida de las actividades intracelulares de las enzimas implicadas en la ruta 4S.

Como se recoge en el Capítulo 1 de este trabajo, la ruta metabólica, a través de la que se produce la transformación de DBT en HBP, consta de cuatro etapas en serie. Las tres primeras son oxidaciones sucesivas controladas por dos monooxigenasas DszC y DszA, dependientes de FMNH₂; y la última etapa consiste en la eliminación del átomo de azufre presente en la molécula de HBPS, mediada por la desulfinasa DszB (Oldfield y col., 1997). El objeto del estudio recogido en el presente capítulo es conocer la evolución de las actividades de las enzimas DszA, B y C a lo largo del tiempo de crecimiento, para buscar una justificación a la capacidad desulfurante que desarrollan las células a lo largo de su edad celular.

4.1 Resultados experimentales

La realización de este estudio ha sido posible a raíz de una serie de datos que se conocían previamente. Por un lado, trabajos previos realizados por el grupo FQPIMA han demostrado que en *Pseudomonas putida* CECT5279 la actividad de la enzima oxidoreductasa HpaC, responsable de aportar el FMNH₂ que necesitan las monooxigenasas que catalizan las tres primeras reacciones de la de la ruta 4S, DszC y DszA, no es limitante para la capacidad desulfurante de este biocatalizador a lo largo de la edad celular del microorganismo (Alcón y col., 2005). En bibliografía diferentes autores plantean la actividad de la oxidoreductasa, de la que dependen DszC y DszA, como etapa limitante en la ruta 4S al emplear diferentes bacterias (Xi y col., 1997; Reichmuth y col., 2000), Konishi y col., 2000). En el caso de *P. putida* CECT5279, la evolución de la capacidad desulfurante que se observa a nivel macroscópico a lo largo del tiempo de crecimiento no se debe a valores limitantes en la actividad de la enzima HpaC, ni en la concentración de equivalentes reducidos para las diferentes edades del microorganismo (Alcón y col., 2005). Esto hace pensar que exista otra causa para explicar dicha evolución, y, permite realizar este estudio a lo largo del tiempo de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 sin que la capacidad desulfurante se vea afectada por estos factores.

Por otro lado, se ha comprobado la ausencia de limitaciones en el transporte de todos los compuestos de esta ruta (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) a través de la membrana celular de *Pseudomonas putida* CECT5279 (Alcón y col., 2005). Esto plantea una simplificación en el procedimiento experimental para la determinación de actividades enzimáticas, ya que es posible trabajar *in vivo*, relacionando directamente las concentraciones medidas en el medio con las que existen dentro de la célula. De forma que se puede relacionar la desaparición de los sustratos azufrados de cada reacción de la ruta 4S con la actividad de la enzima que cataliza cada una de estas reacciones.

Para llevar a cabo estas medidas de la actividad de las enzimas de la ruta 4S, se han puesto en contacto disoluciones tamponadas de DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS, como sustratos de cada una de las reacciones en serie de la ruta 4S, con células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de diferentes edades. Se han obtenido datos experimentales de la evolución de estos compuestos a lo largo del tiempo de ensayo, y

se ha determinado la velocidad inicial de desaparición de cada uno de ellos. La actividad enzimática de cada enzima implicada en la ruta 4S se ha obtenido a partir de los valores de velocidad inicial obtenidos en cada caso.

El conjunto de experimentos propuestos para este trabajo tiene en cuenta el empleo de estos cuatro sustratos azufrados, que forman parte del esquema de cuatro reacciones en serie de la ruta 4S, con seis edades celulares de *P. putida* CECT5279, como se muestra en el diseño experimental, recogido en la Tabla 4.1.

Las seis edades celulares, elegidas para la determinación de las actividades de las enzimas involucradas en la ruta 4S, corresponden a seis estadios de la fase exponencial de crecimiento de este microorganismo. En la Figura 4.1 se muestra la curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279; sobre ella se han señalado los tiempos de crecimiento que se han tomado para este estudio. Se observa que gracias al método de crecimiento estandarizado y optimizado en trabajos previos del grupo de investigación FQPIMA (Martín, 2005), descrito en el Apartado 2.2.2.1 de este trabajo, la buena adaptación del microorganismo al medio de crecimiento BSM permite que no exista una fase de latencia propiamente dicha. Se presenta una fase exponencial de crecimiento que se prolonga a lo largo de 46 h, y una fase estacionaria dura alrededor de 10 h. Los tiempos seleccionados para este estudio fueron 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h.

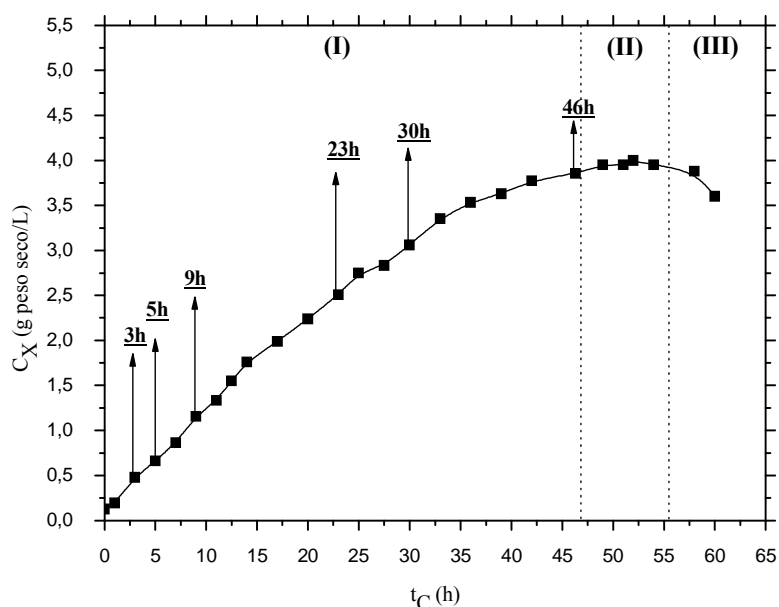


FIGURA 4.1 - Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279. (I) Fase exponencial; (II) fase estacionaria; (III) fase de muerte.

TABLA 4.1 - Programación experimental para la medida de actividades enzimáticas de la ruta 4S.

Código	Sustrato azufrado	Edad celular
		(h)
A-1A	DBT	3
A-2A	DBT	5
A-3A	DBT	9
A-4A	DBT	23
A-5A	DBT	30
A-6A	DBT	46
A-1B	DBTO	3
A-2B	DBTO	5
A-3B	DBTO	9
A-4B	DBTO	23
A-5B	DBTO	30
A-6B	DBTO	46
A-1C	DBTO ₂	3
A-2C	DBTO ₂	5
A-3C	DBTO ₂	9
A-4C	DBTO ₂	23
A-5C	DBTO ₂	30
A-6C	DBTO ₂	46
A-1D	HBPS	3
A-2D	HBPS	5
A-3D	HBPS	9
A-4D	HBPS	23
A-5D	HBPS	30
A-6D	HBPS	46

Para abordar el programa experimental recogido en la anterior Tabla 4.1, se obtuvieron células de seis edades diferentes, a partir de un cultivo en fermentador, siguiendo un protocolo estandarizado, tal y como se describe en el Apartado 2.2.2.1 del Capítulo 2 de esta Memoria. Se tomaron células a 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de crecimiento, y se utilizaron de manera separada, en experimentos de desulfuración, en condiciones de *resting cells*, como se explica en el Apartado 2.2.2.2 del mismo capítulo, empleando, también por separado diferentes compuestos de la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS) como sustratos azufrados de partida de cada reacción de la ruta 4S. La concentración inicial de cada uno de estos compuestos fue de 10 μ M, y la concentración de biomasa empleada en cada uno de estos experimentos fue de 0,7 g peso seco/L. Estos ensayos de desulfuración en condiciones de células en reposo tuvieron una duración de 120 min.

Las muestras recogidas a lo largo de la experimentación se analizaron mediante HPLC, como se describe en el Apartado 2.2.1.4 del Capítulo 2 de la presente Memoria, para conocer la evolución de la concentración de compuestos que participan de la ruta 4S a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos se estudiaron siguiendo la metodología que se describe en el Apartado 2.2.2.3 del mismo capítulo y que se basa en las características particulares de *P. putica* CECT5279 que ya se han comentado. Gracias a esta metodología, se dispone de un método relativamente sencillo para cuantificar la actividad de las enzimas DszC, DszA y DszB, basado en la medida de la velocidad de desaparición de sus respectivos sustratos azufrados (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS). La ventaja de este método reside en poder medir directamente la concentración de estos compuestos en el caldo donde se encuentran las células, para obtener información de lo que sucede en el interior del biocatalizador.

Los datos obtenidos de concentración de cada sustrato azufrado frente al tiempo servirán para estimar el valor de su derivada a tiempo cero. Tras relacionar esa velocidad inicial de eliminación de cada sustrato con la concentración de biomasa empleada en el ensayo, se podrá expresar la actividad de cada enzima según la expresión [2.8].

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la experimentación correspondiente a los experimentos planificados en la Tabla 4.1. En las Tablas 4.2 a 4.7 se recopila la evolución de los sustratos empleados en las cuatro reacciones en serie de la ruta 4S, a lo largo del tiempo de ensayo, empleando células de las citadas seis edades.

Se debe reseñar que a causa del error sistemático asociado al método de análisis que se ha comentado previamente, las concentraciones iniciales registradas para cada uno de los compuestos azufrados de partida no fueron 10 μM en todos los casos.

Asimismo, también se recoge la evolución de la concentración del compuesto final de la ruta 4S (HBP), con el objeto de determinar la capacidad desulfurante de las células de diferente edad, a nivel macroscópico. Esta capacidad desulfurante corresponde a la conversión alcanzada a un tiempo determinado de ensayo de desulfuración según la metodología estandarizada que se describe en el Apartado 2.2.2.2 del Capítulo 2 de este trabajo. En este caso, se han utilizado las condiciones experimentales antes referidas, con una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L y una concentración inicial de DBT de 10 μM . La cuantificación de esta capacidad desulfurante se ha determinado como grado de desulfuración desarrollado tras dos horas de tiempo de ensayo, X_{BDS}^2 , según queda definido en la expresión [3.1] en el Apartado 3.1 de la presente Memoria.

TABLA 4.2 - Resultados obtenidos utilizando células de 3 horas de tiempo de crecimiento en los experimentos A-1A, A-1B, A-1C y A-1D.

Código:	A-1A		A-1B	A-1C	A-1D
t_{BDS}	C_{DBT}	C_{HBP}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	9,9	0,0	9,5	9,5	9,8
5	7,1	0,0	7,3	9,4	9,2
10	5,0	0,8	5,3	9,4	8,9
15	3,3	1,6	3,9	9,3	8,4
20	2,6	2,0	3,1	9,2	7,7
25	2,2	2,7	2,1	8,9	7,6
30	1,6	3,0	1,6	8,8	6,9
60	0,0	5,2	0,4	8,7	5,2
90	0,0	6,1	0,0	8,3	3,4
120	0,0	6,3	0,0	7,8	2,4

TABLA 4.3 - Resultados obtenidos utilizando células de 5 horas de tiempo de crecimiento en los experimentos A-2A, A-2B, A-2C y A-2D.

Código:	A-2A		A-2B	A-2C	A-2D
t_{BDS}	C_{DBT}	C_{HBP}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	10,0	0,0	10,0	9,7	10,0
5	6,1	0,0	6,0	9,3	8,1
10	4,0	1,4	4,1	8,8	6,6
15	2,3	1,7	2,8	8,4	5,6
20	2,0	2,5	1,4	7,8	4,3
25	1,0	2,7	1,0	7,6	3,8
30	0,4	3,2	0,5	7,5	3,6
60	0,0	4,6	0,0	5,2	1,2
90	0,0	5,8	0,0	3,8	0,4
120	0,0	7,0	0,0	2,5	0,0

TABLA 4.4 - Resultados obtenidos utilizando células de 9 horas de tiempo de crecimiento en los experimentos A-3A, A-3B, A-3C y A-3D.

Código:	A-3A		A-3B	A-3C	A-3D
t_{BDS}	C_{DBT}	C_{HBP}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	10,0	0,0	10,0	10,0	10,0
5	6,5	1,7	5,4	8,5	9,9
10	4,0	4,5	4,1	7,7	9,1
15	1,7	5,0	1,9	6,4	8,6
20	0,9	5,5	1,4	6,1	8,4
25	0,3	6,7	0,7	5,0	8,3
30	0,0	7,1	0,4	5,1	7,6
60	0,0	8,0	0,0	2,1	5,5
90	0,0	8,4	0,0	0,8	3,8
120	0,0	8,4	0,0	0,0	2,9

TABLA 4.5 - Resultados obtenidos utilizando células de 23 horas de tiempo de crecimiento en los experimentos A-4A, A-4B, A-4C y A-4D.

Código:	A-4A		A-4B	A-4C	A-4D
t_{BDS}	C_{DBT}	C_{HBP}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBP}S
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	10,0	0,0	9,7	10,0	9,6
5	5,1	2,1	5,5	7,2	9,2
10	2,5	2,3	3,1	5,2	9,2
15	2,1	2,9	1,7	4,1	9,1
20	1,0	3,5	1,1	2,1	8,6
25	0,8	4,0	0,4	1,5	8,2
30	0,4	4,2	0,2	1,2	7,9
60	0,0	4,8	0,0	0,2	6,7
90	0,0	5,2	0,0	0,0	5,1
120	0,0	5,8	0,0	0,0	5,7

TABLA 4.6 - Resultados obtenidos utilizando células de 30 horas de tiempo de crecimiento en los experimentos A-5A, A-5B, A-5C y A-5D.

Código:	A-5A		A-5B	A-5C	A-5D
t_{BDS}	C_{DBT}	C_{HBP}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBP}S
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	10,0	0,0	10,6	9,5	9,9
5	5,3	2,7	5,9	6,8	9,9
10	3,0	3,5	4,0	5,0	9,8
15	2,0	3,7	2,1	3,7	9,8
20	1,0	4,2	1,4	2,5	9,5
25	0,9	4,5	0,9	1,6	9,6
30	0,2	4,9	0,3	1,4	9,6
60	0,0	5,3	0,0	0,5	9,2
90	0,0	5,7	0,0	0,0	8,8
120	0,0	6,0	0,0	0,0	8,4

TABLA 4.7 - Resultados obtenidos utilizando células de 46 horas de tiempo de crecimiento en los experimentos A-6A, A-6B, A-6C y A-6D.

Código:	A-6A		A-6B	A-6C	A-6D
t_{BDS}	C_{DBT}	C_{HBP}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	10,0	0,0	10,0	10,0	10,2
5	7,0	0,0	7,8	7,5	10,1
10	4,5	0,0	6,0	5,8	10,1
15	3,2	0,0	4,3	4,2	9,9
20	2,6	0,0	3,5	2,9	9,8
25	1,4	0,0	2,1	2,3	9,6
30	1,0	0,0	1,5	1,8	9,2
60	0,1	0,0	0,2	0,8	8,8
90	0,0	2,0	0,0	0,0	8,4
120	0,0	4,7	0,0	0,0	7,7

4.2 Determinación de la actividad enzimática intracelular

A continuación se aborda, a partir de los datos experimentales obtenidos, la determinación de la actividad enzimática en cada una de las reacciones de la ruta 4S y las seis edades celulares empleadas. En todos los casos se ha seguido la misma metodología y se ha realizado el ajuste a los datos iniciales, como se explica a continuación.

Las curvas de consumo de cada sustrato se ajustaron a una función exponencial decreciente según se recoge en la ecuación [4.1]:

$$C_j = \delta_j \cdot \exp(-\epsilon_j \cdot t) \quad [4.1]$$

de manera que, al calcular el valor de la derivada a tiempo cero y referirlo a la biomasa empleada en el *resting*, se obtiene la actividad a tiempo cero (García-Ochoa y col., 1993) .

La derivada a tiempo cero se puede calcular fácilmente de manera analítica, de forma que la actividad de cada enzima se expresa también como se muestra en la expresión [4.2].

$$a_i = - \left. \frac{dC_j}{C_X \cdot dt} \right|_{t=0} = \frac{\varepsilon_j \cdot \delta_j}{C_X} \quad [4.2]$$

Los primeros datos de consumo de cada uno de los compuestos azufrados empleados para el cálculo de cada una de las actividades enzimáticas, se han empleado para realizar un ajuste según la ecuación exponencial que se muestra en la expresión [4.1], mediante el empleo del software Aspen Custom Modeler®, como se describe en el apartado 2.3 del Capítulo 2 de la presente Memoria.

De esta manera, conociendo la concentración de biomasa empleada (0,7 g peso seco/L) y los valores obtenidos de los parámetros δ_j y ε_j , se puede calcular la actividad de cada enzima, según la expresión [4.2] comentada previamente.

A continuación se muestran los resultados obtenidos, para cada una de las cuatro reacciones en serie que componen la ruta 4S. Las dos primeras etapas consisten en las dos oxidaciones sucesivas de DBT a DBTO y de DBTO a DBTO₂, que están catalizadas por la misma enzima monooxigenasa DszC (Oldfield y col., 1997). La tercera etapa es la oxidación de DBTO₂ a HBPS, catalizada por la monooxigenasa DszA y la cuarta es la verdadera eliminación de azufre, mediante la desulfinaasa DszB para transformar HBPS en HBP.

Se describen las observaciones derivadas del estudio de cada reacción de la ruta 4S, a fin de estudiar el comportamiento de las tres enzimas a lo largo del tiempo de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279; y en el caso de la primera enzima de la ruta, la monooxigenasa DszC, la influencia del sustrato empleado DBT o DBTO.

4.2.1 PRIMERA REACCIÓN: OXIDACIÓN DE DBT

En la Figura 4.2 se muestra la evolución de la concentración de DBT en los primeros 30 min de ensayo en condiciones de *resting cells* empleando células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento. Las líneas continuas representan las ecuaciones de ajuste para cada edad celular. En la Tabla 4.8 se recogen los valores calculados de los parámetros δ y ϵ , según la ecuación [4.1] antes mencionada, para esta primera reacción y la actividad de la enzima DszC frente a DBT como sustrato, para las células de seis tiempos de crecimiento diferentes empleadas. En la Figura 4.3 se muestra la evolución de la actividad de la enzima DszC frente a DBT a lo largo del tiempo de crecimiento.

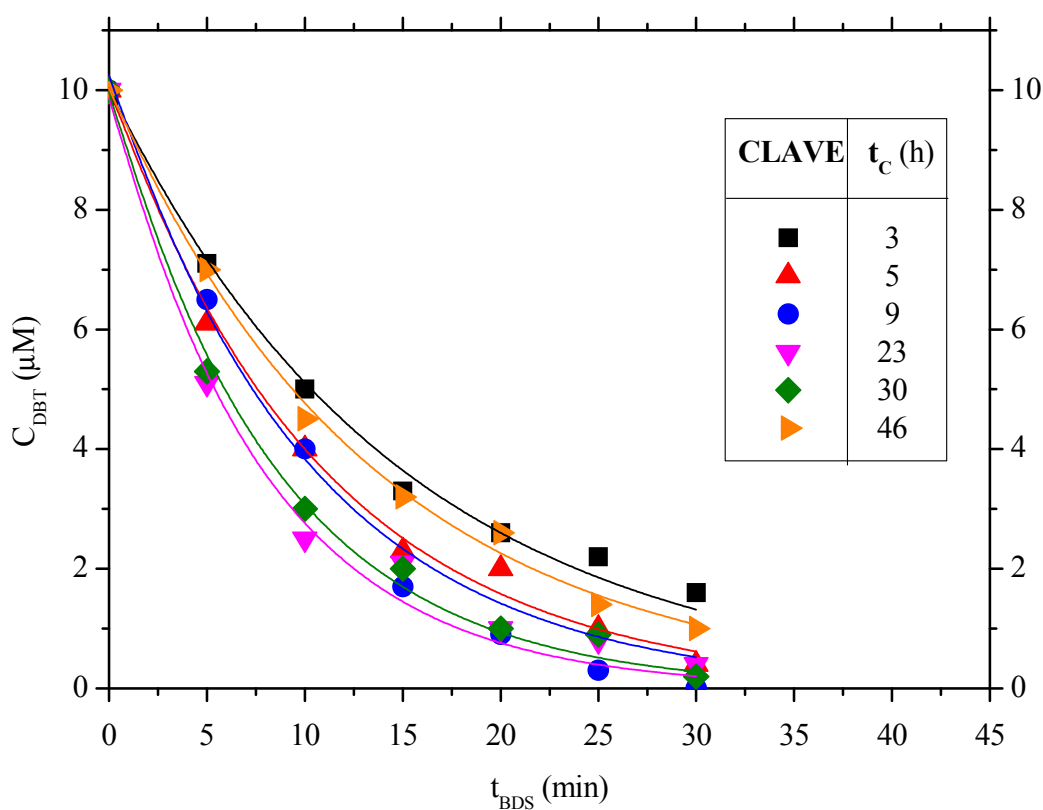


FIGURA 4.2 - Evolución a lo largo del tiempo de la concentración de DBT para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento

TABLA 4.8 - Valores calculados de los parámetros δ y ϵ , y de la actividad de la enzima DszC en la primera reacción de la ruta 4S, para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

t_c	δ_{DBT}	ϵ_{DBT}
(h)	(μM)	(min^{-1})
3	10,00 \pm 0,17	0,068 \pm 0,006
5	10,03 \pm 0,14	0,093 \pm 0,008
9	10,25 \pm 0,24	0,099 \pm 0,015
23	9,88 \pm 0,16	0,129 \pm 0,017
30	9,96 \pm 0,12	0,119 \pm 0,011
46	10,03 \pm 0,13	0,075 \pm 0,005

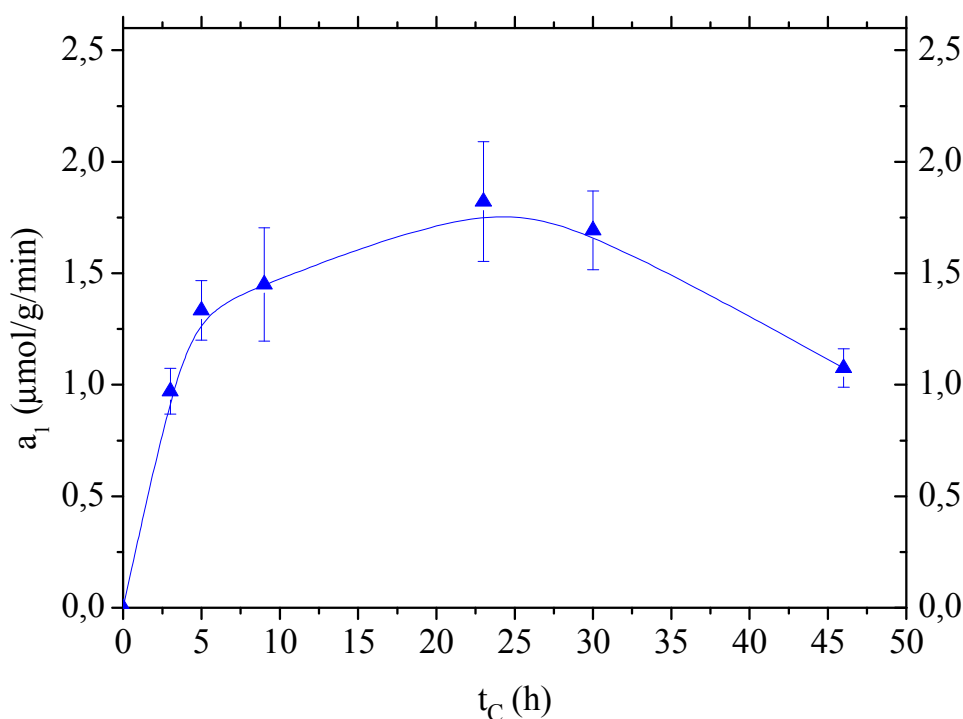


FIGURA 4.3 - Evolución de los valores de actividad de la enzima DszC frente al sustrato DBT a lo largo del tiempo de crecimiento.

A la vista de la evolución de la concentración de DBT frente al tiempo en la Figura 4.2, la eliminación de este sustrato parece ser más rápida al emplear células de 23 y 30 h de tiempo de crecimiento que para el resto de edades celulares empleadas. El uso de células de la edad más baja (3 h) y la más elevada (46 h) da lugar a las menores velocidades de eliminación de DBT.

La evolución de los valores de actividad de la enzima DszB frente a DBT a lo largo del tiempo de crecimiento, mostrada en la Figura 4.3, permite decir que los valores obtenidos de actividad experimentan un aumento rápido a tiempos cortos de crecimiento, y que, a partir de la mitad de la fase exponencial, alrededor de las 23 h, sufren una caída más lenta. De esta manera, los valores obtenidos para la actividad de DszC frente a DBT presentan un máximo cuando se emplean células de 23 h de edad celular ($1,821 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$). Por ello, y como se observa en la Figura 4.2, las células tomadas del fermentador a las 30 h aún presentan valores elevados de velocidad de desaparición de DBT, como se comprueba en la Figura 4.3, en la que se observa que las células de 30 horas presentan una actividad en DszC con DBT como sustrato de $1,692 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$.

4.2.2 SEGUNDA REACCIÓN: OXIDACIÓN DE DBTO

La evolución de la concentración de DBTO cuando se emplea como sustrato para estudiar la segunda reacción de la ruta 4S, según la cual este compuesto se transforma en DBTO_2 , se muestra en la Figura 4.4 para las seis edades celulares estudiadas (3, 5, 9, 23, 30 y 46 h).

Dado que tanto esta reacción como la primera de las reacciones de la ruta 4S están catalizadas por la misma enzima monooxigenasa DszC (Oldfield y col., 1997), y puesto que existe una semejanza estructural entre las moléculas de DBT y DBTO, se pueden observar semejanzas en los resultados obtenidos al estudiar esta segunda etapa de la ruta 4S respecto a las conclusiones recogidas del estudio de la primera etapa. Las células de 23 y 30 h de crecimiento también presentan la mayor velocidad de eliminación de este sustrato. Si bien, frente a DBTO las células de 5 y 9 h, aunque algo más lentas en su eliminación, se acercan mucho más a la situación de las de 23 y 30 h que en el caso anterior.

De nuevo las células de menor y mayor edad probadas, son las que proporcionan las caídas de concentración de DBTO más lentas, con la diferencia, con respecto al caso de DBT, de que las células de 46 h son las que proporcionan la menor eliminación de DBTO entre las edades probadas.

Los valores calculados de los parámetros δ y ϵ según la ecuación [4.1] para la segunda reacción de la ruta 4S y la actividad de la enzima DszC frente a DBTO al emplear células de 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de edad se recogen en la Tabla 4.9. Como se refleja en dicha Tabla 4.9, también la evolución de los valores de los parámetros obtenidos es parecida a la de los de la primera reacción. En la Figura 4.5, se muestra la evolución de la actividad de la enzima DszC frente a DBTO para las diferentes edades celulares empleadas. Los valores obtenidos de actividad enzimática experimentan un rápido aumento a tiempos cortos de crecimiento. Se presenta un máximo de actividad al emplear células de 23 h de edad celular (1,685 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$) como sucede al utilizar DBT como sustrato azufrado. Además, tras este máximo, las actividades vuelven a disminuir de forma análoga al caso anterior. Los valores de actividad de esta enzima para los tiempos de crecimiento de 5, 9, y 30 h se mueven dentro de un intervalo entre los 1,3 y 1,5 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$. Las células de 3 y 46 h de tiempo de crecimiento presentan los valores más bajos de actividad (0,885 y 0,794 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$, respectivamente).

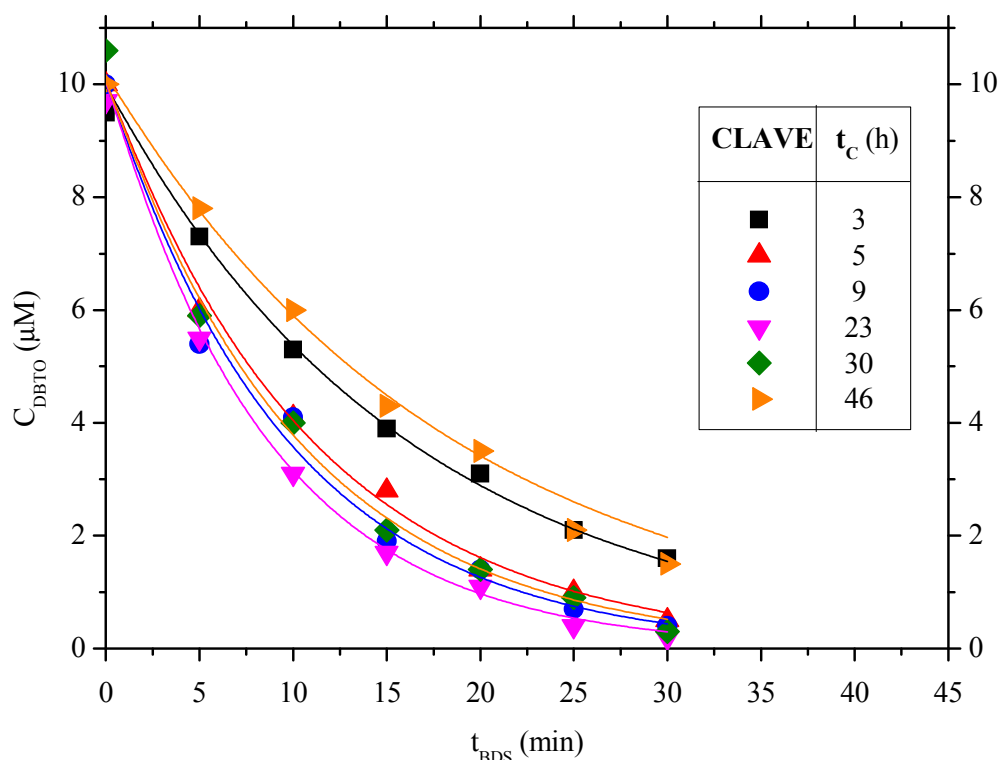


FIGURA 4.4 - Evolución a lo largo del tiempo de la concentración de DBTO para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

TABLA 4.9 - Valores calculados de los parámetros δ y ϵ , y de la actividad de la enzima DszC en la segunda reacción de la ruta 4S, para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

t_C	δ_{DBTO}	ϵ_{DBTO}
(h)	(μM)	(\min^{-1})
3	9,97 \pm 0,17	0,062 \pm 0,005
5	10,05 \pm 0,12	0,092 \pm 0,007
9	10,02 \pm 0,20	0,104 \pm 0,014
23	10,05 \pm 0,08	0,117 \pm 0,007
30	10,06 \pm 0,18	0,099 \pm 0,012
46	10,16 \pm 0,21	0,055 \pm 0,005

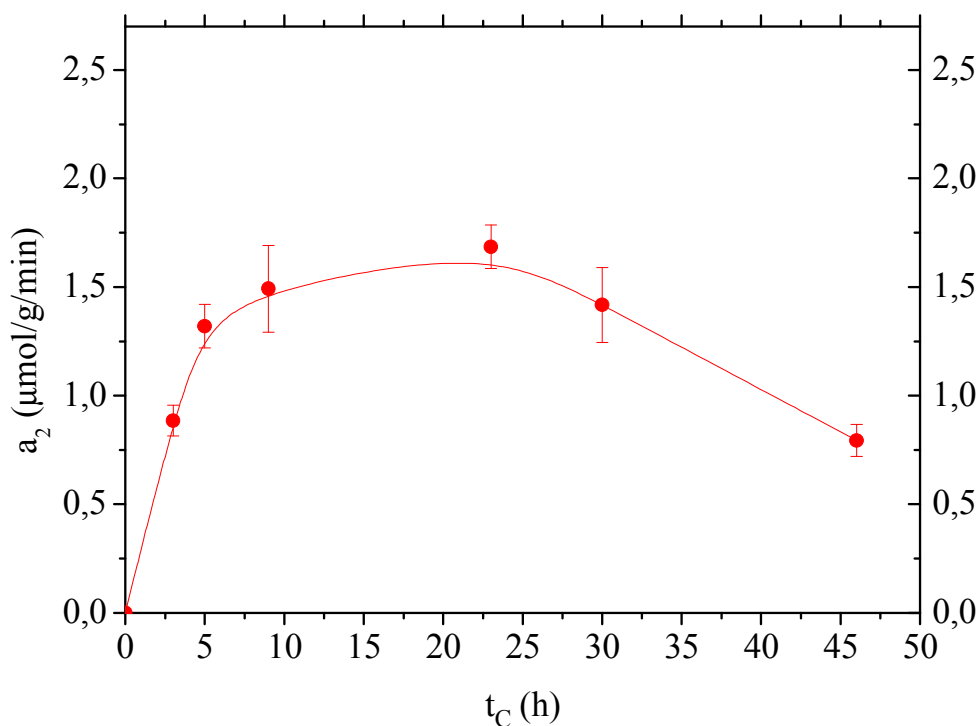


FIGURA 4.5 - Evolución de los valores de actividad de la enzima DszC frente al sustrato DBTO a lo largo del tiempo de crecimiento.

4.2.3 TERCERA REACCIÓN: OXIDACIÓN DE DBTO₂

En la Figura 4.6 se muestran los datos de evolución de la concentración de DBTO₂ a lo largo del tiempo de ensayo, empleando células de los seis tiempos de crecimiento estudiados. Al emplear este sustrato azufrado se puede estudiar la segunda monooxigenasa implicada en la ruta 4S, la enzima DszA.

Los resultados que se obtienen reflejan un comportamiento con la edad celular algo diferente al registrado en el caso de la enzima DszC en las dos reacciones previas de la ruta. La velocidad de eliminación de DBTO₂ aumenta progresivamente con la edad. Las células de 23, 30 y 46 h de edad son los mejores biocatalizadores para esta reacción; la velocidad de caída de concentración de sustrato para estas células es muy parecida. A diferencia con el comportamiento observado en las reacciones primera y segunda de la ruta 4S, catalizadas por la monooxigenasa DszC, se refleja en la citada figura una evolución prácticamente saturante de la actividad de la enzima DszA conforme aumente la edad celular. La velocidad de eliminación de DBTO₂ aumenta considerablemente desde 3 a 23 h de tiempo de crecimiento, mientras que permanece en valores muy similares al emplear edades celulares de 23, 30 y 46 h.

En la Tabla 4.10, se recopilan los valores de los parámetros que se han obtenido al ajustar los datos de evolución de DBTO₂. En la Figura 4.7 se muestra la evolución de la actividad de la enzima DszA con el tiempo de crecimiento. Se puede observar un aumento progresivo de actividad de la enzima DszA al emplear tiempos de crecimiento de 3, 5 y 9 h. Los máximos valores se presentan al emplear células de 23 y 30 h, estando estos valores de actividad medida alrededor de 1 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$. A diferencia con la enzima DszC, la caída de actividad, tras alcanzar este valor máximo, es mucho más ligera, manteniéndose un valor medido de actividad de DszA 0,835 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ a las 46 h de tiempo de crecimiento del biocatalizador.

Esta monooxigenasa DszA, igual que lo hace DszC, desarrolla su máxima actividad frente al sustrato azufrado en células de *P. putida* CECT5279 tomadas alrededor de la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Si bien, no se presenta una pérdida de actividad tan aguda, como en el caso de la enzima DszC, al emplear edades mayores, al final de esa fase exponencial.

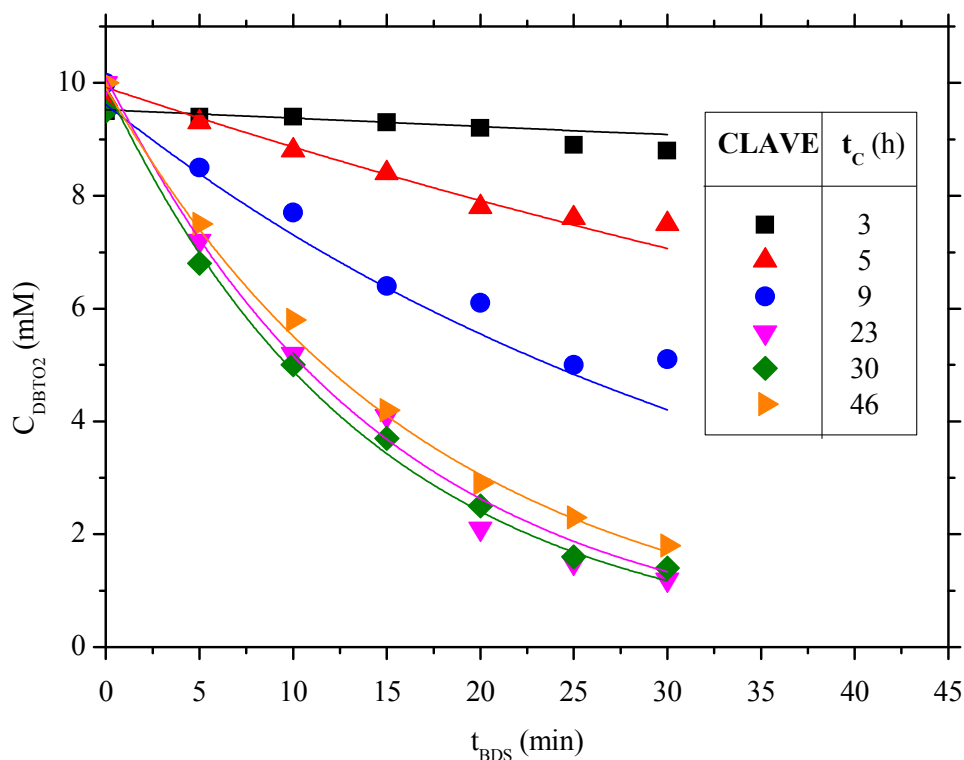


FIGURA 4.6 - Evolución a lo largo del tiempo de la concentración de DBTO₂ para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

TABLA 4.10 - Valores calculados de los parámetros δ y ϵ , y de la actividad de la enzima DszA en la tercera reacción de la ruta 4S, para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

t_c	δ_{DBTO_2}	ϵ_{DBTO_2}
(h)	(μM)	(min^{-1})
3	9,52 \pm 0,03	0,002 \pm 0,000
5	10,34 \pm 0,18	0,010 \pm 0,003
9	9,62 \pm 0,19	0,028 \pm 0,010
23	10,09 \pm 0,22	0,067 \pm 0,008
30	9,90 \pm 0,19	0,071 \pm 0,007
46	9,91 \pm 0,17	0,059 \pm 0,005

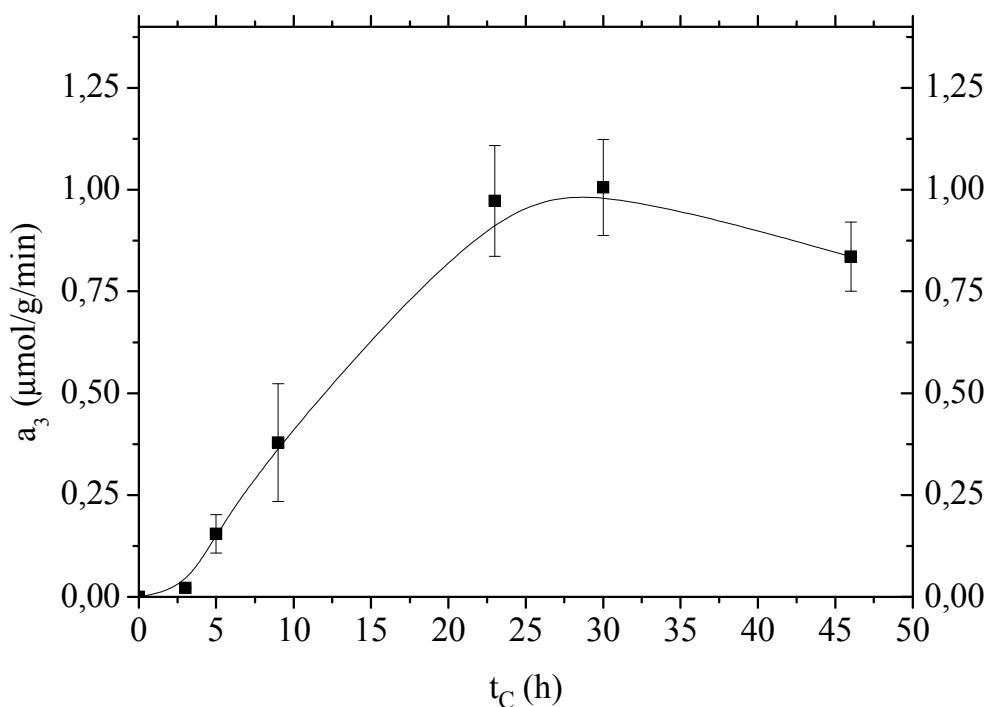


FIGURA 4.7 - Evolución de los valores de actividad de la enzima DszA lo largo del tiempo de crecimiento.

4.2.4 CUARTA REACCIÓN: ELIMINACIÓN DEL ÁTOMO DE AZUFRE DE HBPS

Los resultados obtenidos al emplear HBPS como sustrato azufrado se representan en la Figura 4.8. Al analizar las evoluciones obtenidas a lo largo de las seis edades celulares probadas, se presenta una evolución muy diferente a los casos anteriores. Sorprende una disminución en la concentración de HBPS mucho más pronunciada al emplear células de tiempos de crecimiento muy cortos. La desaparición del sustrato azufrado es mayor, en el caso de la enzima DszB, al emplear células de 5 h de edad. Conforme se han utilizado células de 9, 23, 30 y 46 h, la velocidad de desaparición de HBPS ha ido reduciéndose. El patrón de comportamiento de la enzima DszB difiere notablemente del que presentan DszA y DszC. La conversión de HBPS es

muy baja en todos los casos, no así cuando se ha empleado DBT, DBTO y DBTO₂ para estudiar la actividad de las dos enzimas monooxigenasas. Sin embargo, es muy particular que exista tanta variación en un intervalo de edad tan corto.

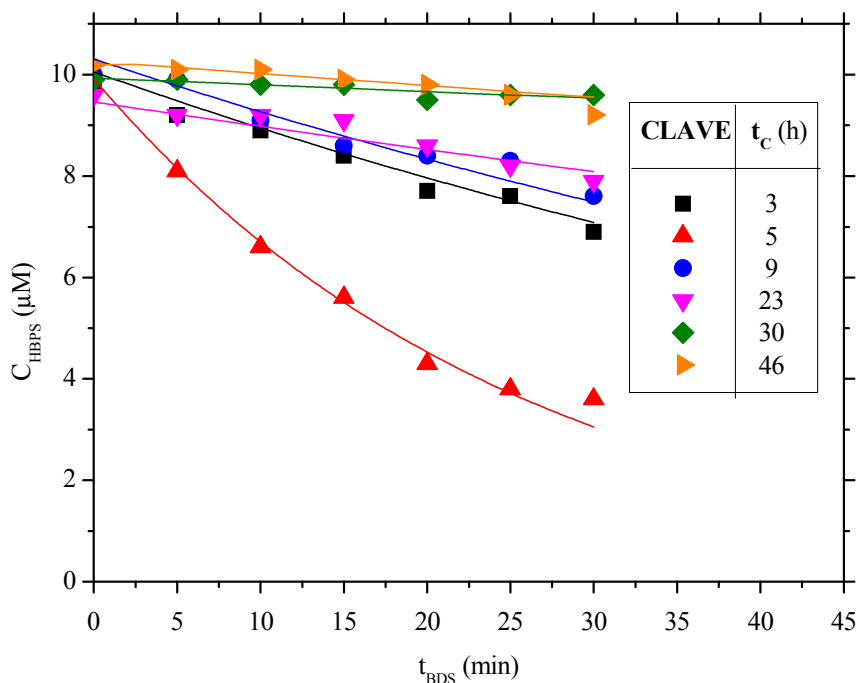


FIGURA 4.8 - Evolución a lo largo del tiempo de la concentración de HBPS para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

TABLA 4.11 - Valores calculados de los parámetros δ y ϵ , y de la actividad de la enzima DszB en la cuarta reacción de la ruta 4S, para 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h de tiempo de crecimiento.

t_c	δ_{HBPS}	ϵ_{HBPS}
(h)	(μM)	(min^{-1})
3	10,05 \pm 1,31	0,0127 \pm 0,0027
5	9,91 \pm 0,26	0,0392 \pm 0,0040
9	10,31 \pm 4,54	0,0107 \pm 0,0004
23	9,46 \pm 0,23	0,0052 \pm 0,0006
30	9,93 \pm 0,03	0,0014 \pm 0,0001
46	10,20 \pm 0,06	0,0024 \pm 0,0001

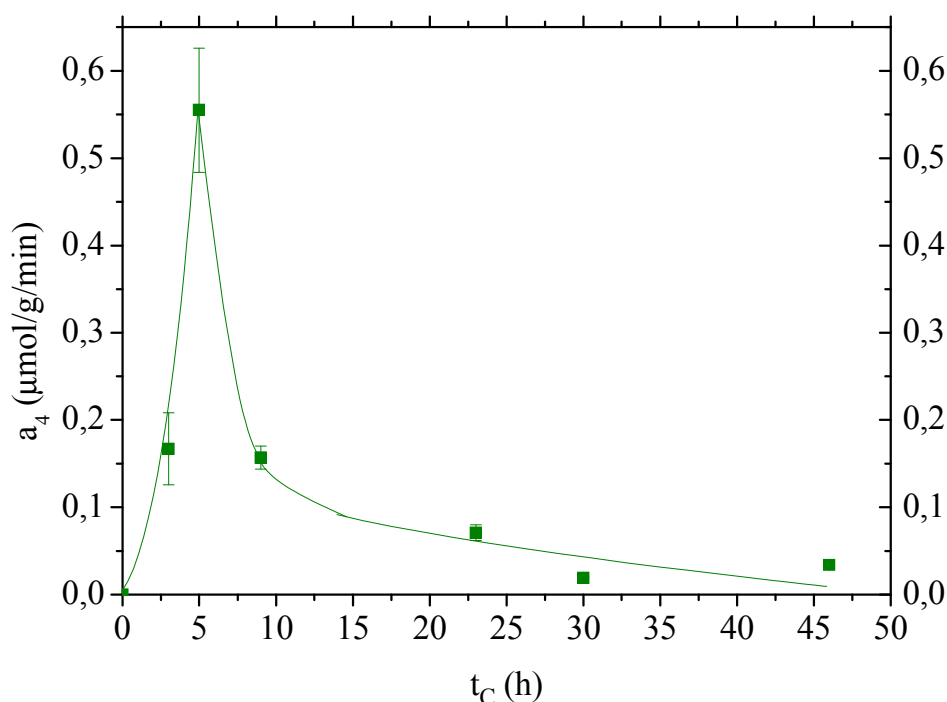


FIGURA 4.9 - Evolución de los valores de actividad de la enzima DszB a lo largo del tiempo de crecimiento.

En la Tabla 4.11 se recogen los parámetros de ajuste de los datos que se muestran en la Figura 4.8, y en la Figura 4.9 se presentan los valores calculados de actividad de la enzima DszB para células crecidas en biorreactor hasta 3, 5, 9, 23, 30 y 46 h. La evolución de estos parámetros está de acuerdo con lo observado en la Figura 4.8, el perfil de actividad de la enzima DszB es radicalmente distinto al que presentan DszA y DszC. La mayor velocidad de desaparición de HBPS se corresponde con un máximo en la actividad medida a 5 h de tiempo de crecimiento ($0,555 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$). Para las células de 3 y 9 h de edad, la actividad medida de la enzima DszB se encuentra alrededor de los $0,16 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$; y para edades superiores a 9 h se obtiene un valor por debajo de los $0,10 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$. Así, se observa un máximo de actividad desulfinasa al emplear células de 5 h de edad. A partir de este máximo, la pérdida de actividad es muy rápida y pronunciada para células crecidas después de la mitad de la fase exponencial de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279.

Los valores obtenidos de actividad intracelular de la enzima DszB para cada tiempo de crecimiento son sustancialmente más bajos que los obtenidos para DszC y

DszA en las primeras reacciones. La actividad máxima registrada para la monooxigenasa DszC frente a DBT es casi cuatro veces mayor que el máximo que alcanza la enzima DszB. Por lo tanto, la última reacción de la ruta 4S es la más lenta, lo que está de acuerdo con la información en bibliografía: la eliminación del átomo de azufre de HBPS para su transformación en HBP, catalizada por la desulfinaasa DszB, es la etapa controlante de la ruta 4S (Gray y col. 1996; Santos y col., 2007).

La presencia de este máximo de actividad de la enzima DszB a un tiempo de crecimiento tan bajo, llevó a realizar un estudio complementario. Se decidió medir la concentración de enzima presente en la célula para comprender la evolución de la actividad observada a lo largo del tiempo de crecimiento.

4.2.4.1 Cuantificación de la proteína DszB producida

De entre las tres enzimas estudiadas, el comportamiento de la desulfinaasa DszB es el más sorprendente. Esta enzima no parece seguir el mismo patrón que las otras dos monooxigenasas de la ruta 4S. La presencia de un máximo de actividad a tiempos cortos de crecimiento hace pensar en dos hipótesis para explicar este comportamiento. Por un lado, es posible que se produzca una inactivación de la proteína generada a partir de las 5 h de edad celular, que impida su acción catalítica sobre la cuarta etapa de la ruta 4S. Por otro lado, cabe la posibilidad de que la enzima sea destruida en el interior de las células de *Pseudomonas putida* por acción de alguna proteasa.

Por este motivo, debido al carácter controlante sobre la ruta 4S que tiene la etapa que cataliza esta proteína (Gray y col., 1996; Santos y col., 2007) y por la diferente naturaleza de esta enzima, se decidió realizar la medida de la cantidad de proteína DszB producida en la célula a lo largo de la curva de crecimiento. Para ello se utilizaron muestras recogidas a cinco tiempos de crecimiento (5, 9, 23, 30 y 46 h de edad celular). Hubo que desarrollar un inmuno-ensayo basado en electroforesis PAGE-SDS y la posterior unión selectiva de la enzima a un anticuerpo.

• Resultados experimentales

Para conocer la cantidad de enzima presente en las muestras de biomasa, como se explica en el Apartado 2.2.1.3 de la presente Memoria, se desarrolló un método de inmunoelectroforesis. Mediante la inoculación en conejos de la proteína DszB

procedente de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se obtuvo el anticuerpo primario frente a la proteína. Las muestras obtenidas a los tiempos de crecimiento que se han mencionado, se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE, y el gel obtenido se sometió a transferencia *Western-Blot* a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se trató primero con el anticuerpo para DszB, y posteriormente con un anticuerpo secundario que se une al primero y permite el revelado de las bandas que se generaron. La intensidad de absorbancia de las bandas generadas correspondientes a la proteína se cuantificó mediante un sistema de escáner y un software específico.

Con el objetivo de conocer la concentración total de proteína, se realizó la determinación de la citada concentración proteica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), que se detalla en el Apartado 2.2.1.2 de este trabajo. El objeto es conocer el volumen de cada muestra que habría de tomarse para cargar un gel de poliacrilamida con SDS con 10 µg de proteína total de cada muestra. Se llevó a cabo la electroforesis y la transferencia del gel resultante a una membrana de nitrocelulosa. Se puso en contacto esta membrana con el anticuerpo primario para conseguir la unión selectiva a la proteína buscada, y posteriormente con el anticuerpo secundario que permitirá el posterior revelado con un agente quimioluminiscente.

La Figura 4.10 muestra las bandas correspondientes a la proteína DszB en la membrana de nitrocelulosa después de la electroforesis, la transferencia *Western-Blot* y el revelado. El análisis mediante un sistema de escáner y el *software* Quantity One®, permitieron obtener los valores de absorbancia, correspondientes a muestras con 10 µg de proteína total de cinco edades celulares (5, 9, 23, 30 y 46 h), que se recogen en la Tabla 4.12. Se observa una evolución creciente de absorbancia a lo largo del tiempo de crecimiento. Esto se corresponde con una mayor proporción de proteína DszB sobre el contenido proteico total en las muestras, conforme aumenta el tiempo de crecimiento.

Los resultados obtenidos mediante el método anterior están referidos a 10 µg de proteína celular. Sin embargo, los valores de actividad de la enzima DszB obtenidos y recopilados en el Apartado 4.1 de este Capítulo están referidos a la cantidad de biomasa utilizada de células de cada tiempo de crecimiento. A fin de poder comparar la evolución de actividad de la enzima DszB, con la evolución de la cantidad de enzima producida a lo largo de la curva de crecimiento, es necesario conocer si la producción de proteína total en la célula cambia o no a lo largo del tiempo de crecimiento, y si se puede establecer una relación entre la cantidad de proteína total y la cantidad de

biomasa. De esta manera, se podrán interpretar adecuadamente los resultados y conocer cuál es el comportamiento que experimenta la proteína DszB al aumentar la edad celular en el biocatalizador.

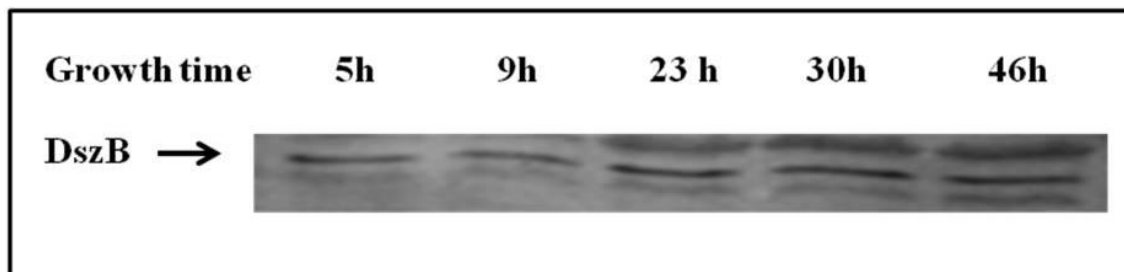


FIGURA 4.10 - Detalle de las bandas correspondientes a la proteína DszB en una membrana de nitrocelulosa obtenida por Western-Blot y tras su revelado.

TABLA 4.12 - Resultados de la cuantificación de las bandas de DszB para muestras de 10 μg tomadas a 5, 9, 23, 30 y 46 h de edad celular.

t_c	Valor de absorbancia relativo al blanco
(h)	(UA/10 μg)
5	5,489
9	3,487
23	7,149
30	10,866
46	12,441

- **Determinación de la producción de proteína total**

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) según se detalla en el Apartado 2.2.1.1, para medir la cantidad de proteína total de cinco muestras tomadas a tiempos de crecimiento de 5, 9, 23, 30 y 46 h, de la misma manera que se hizo para el apartado anterior. El volumen tomado de cada muestra tras causar la ruptura celular fue de 7,5 μL .

En la Tabla 4.13 se muestra la concentración de biomasa de cada uno de los concentrados celulares obtenidos para cada edad celular y empleados para el análisis. Se muestra además la concentración de proteína total obtenida para cada una de las

muestras mediante el método Bradford. Al relacionar la cantidad de proteína celular total y la cantidad de biomasa, se obtuvo una relación constante entre ambas magnitudes. De esta manera, la cantidad de proteína total media presentó un valor de 0,33 g/g peso seco.

Este resultado permitirá relacionar la cantidad de proteína DszB y la cantidad de biomasa a cada tiempo de crecimiento, para, así, estudiar si la evolución de su producción y de su actividad con la edad celular puede explicar el comportamiento de esta enzima, como se describe a continuación. Una vez conocida una relación entre la cantidad de biomasa y la cantidad de proteína total, se puede estudiar la evolución de la proteína DszB por gramo de biomasa en peso seco a lo largo de la curva de crecimiento. Esta evolución se representa en la Figura 4.11, junto con los valores de actividad intracelular obtenidos para esta enzima.

En esta Figura 4.11, se observa una drástica caída de actividad de la enzima DszB a partir de 5 h de tiempo de crecimiento, mientras que la absorbancia debida a DszB a lo largo de la edad celular aumenta progresivamente. Esta situación descarta una de las dos hipótesis que explicarían el comportamiento de la enzima desulfinaasa DszB. Al continuar creciendo la producción de la proteína con el tiempo de crecimiento, se elimina la posibilidad de una destrucción de la enzima por causa de alguna acción proteolítica. La pérdida de actividad desulfinaasa a pesar del aumento en la producción de esta enzima hace pensar en una inactivación de la proteína que cataliza la última etapa de la ruta 4S.

TABLA 4.13- Resultados obtenidos tras la medida de proteína total a partir de muestras de 5, 9, 23, 30 y 46 h de edad celular.

t_c	C_X resuspendida	C_{prot}	C_{prot}/C_X
(h)	(g peso seco/L)	(g/L)	(g/g peso seco)
5	9,11	2,47	0,27
9	8,07	2,65	0,33
23	8,10	2,72	0,34
30	8,39	2,74	0,33
46	8,10	2,95	0,36

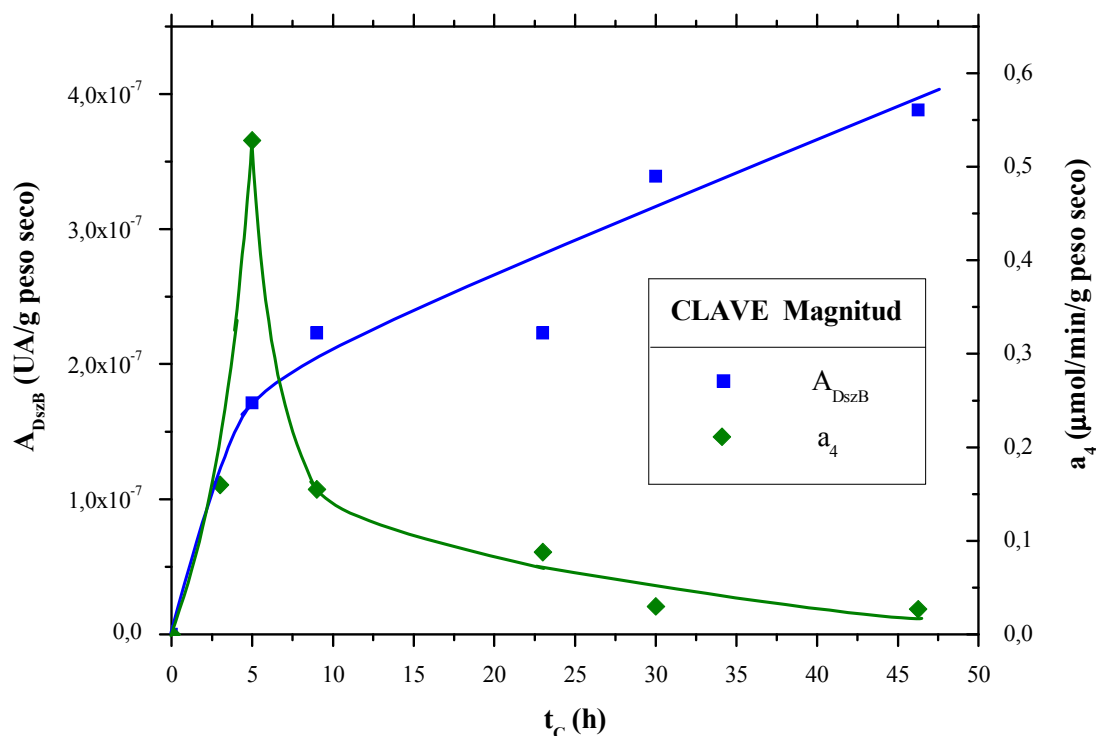


FIGURA 4.11 - Evolución de la absorbancia correspondiente a DszB y de la actividad de la enzima a lo largo del tiempo de crecimiento.

4.3 Implicaciones derivadas de este estudio

En la Figura 4.12 se recogen los valores de actividad obtenidos en cada una de las cuatro reacciones de la ruta 4S calculadas según la ecuación 4.1 y los valores calculados para el grado de desulfuración a las dos horas de experimentación, X_{BDS}^2 , para las seis edades celulares probadas. En la Figura 4.12 (a), la capacidad desulfurante y la concentración de biomasa, y en la Figura 4.12 (b) se muestra la evolución de las actividades enzimáticas intracelulares a lo largo de la edad celular, t_c .

Al observar la evolución del grado de desulfuración en la mencionada Figura 4.12 (a), se presenta un máximo de capacidad desulfurante a tiempos cortos de crecimiento, alrededor de las 9 h, como se había ya comentado previamente a raíz de la experimentación preliminar en el Capítulo 3 de la presente Memoria.

Como se ha venido comentando a lo largo del presente capítulo, cada una de las enzimas de la ruta 4S presenta un máximo en su actividad a un tiempo de crecimiento diferente. Así se refleja en la Figura 4.12 (b). Para la monooxigenasa DszC, los mayores valores de actividad se manifiestan al emplear células de 23 h. En el caso de la monooxigenasa DszA, se presenta un máximo de actividad al usar células de 23 y 30 h de tiempo de crecimiento. Finalmente, la desulfinasas DszB muestra la mayor actividad al emplear un tiempo de crecimiento de sólo 5 h. Sin embargo, como se ha comentado al principio de este capítulo, y se muestra en los resultados preliminares en el Capítulo 3 de esta Memoria, ninguna de estas edades se corresponde con el tiempo de crecimiento al que las células de *Pseudomonas putida* CECT5279 alcanzan la mayor conversión de DBT en HBP, que resulta ser de 9 h.

El comportamiento que presentan las células de alrededor de 9 h de edad, se puede explicar a la luz de la evolución de cada una de las actividades de las enzimas de la ruta 4S.

Como se ha descrito al estudiar cada reacción por separado, la evolución que se ha obtenido al medir la actividad de la enzima DszC frente a DBT y frente a DBTO es bastante parecida. Los valores calculados de a_1 y a_2 son similares hasta que el tiempo de crecimiento es de 23 h; en ambos casos se presenta un máximo de actividad a esta edad celular. En el caso de emplear DBT como sustrato azufrado, se obtiene un valor mayor de actividad de esta enzima. La velocidad de oxidación de DBT catalizada por la monooxigenasas DszC es mayor que la de DBTO. A tiempos altos de crecimiento, esta diferencia en la eliminación de DBT y DBTO por parte de DszC se mantiene; y así los valores obtenidos de a_1 son mayores a los de a_2 a edades celulares de 23, 30 y 46 h.

El comportamiento de la segunda monooxigenasa, DszA es algo diferente al de la enzima DszC. La actividad de la enzima monooxigenasa DszA experimenta un crecimiento más moderado hasta llegar a alcanzar su máximo de actividad. Este máximo se presenta entre las 23 y 30 de tiempo de crecimiento. Tras este máximo la actividad de la enzima se sufre una caída muy ligera. Los valores de actividad obtenidos para la monooxigenasa DszA son menores a los de la enzima DszC.

Los valores obtenidos de actividad intracelular de la enzima DszB para cada tiempo de crecimiento son sustancialmente más bajos que los obtenidos para DszC y DszA en las primeras tres reacciones. La actividad máxima registrada para la monooxigenasa DszC frente a DBT es casi cuatro veces mayor que el máximo que

alcanza la enzima DszB. La última reacción de la ruta 4S es la más lenta. Estos resultados corroboran la información, presente en bibliografía, sobre el hecho de que muestra que la última etapa de la ruta 4S, consistente en la eliminación del átomo de azufre de HBPS para su transformación en HBP, catalizada por la desulfinasas DszB, es la etapa controlante del esquema de reacción (Gray y col., 1996; Santos y col., 2007).

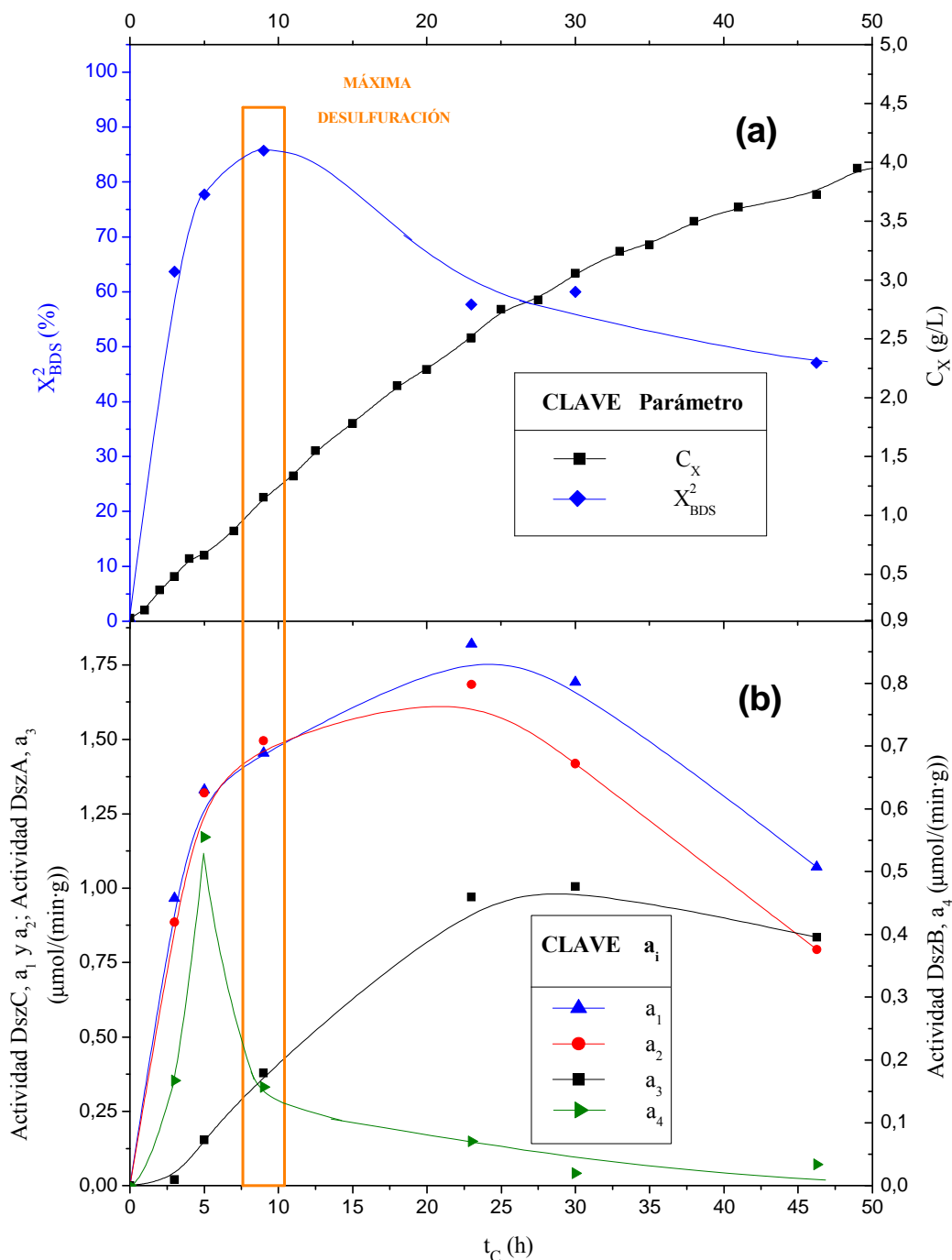


FIGURA 4.12 - (a) Evolución de la concentración de biomasa y la capacidad desulfurante del biocatalizador a lo largo del tiempo de crecimiento. (b) Evolución de las actividades intracelulares de las enzimas DszABC a lo largo del tiempo de crecimiento.

Estos diferentes patrones de evolución actividad de las tres enzimas DszABC a lo largo de la curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 permiten explicar el máximo de capacidad desulfurante observado alrededor de 9 h de edad celular, detectado en el Capítulo 3 de esta Memoria. La confluencia de actividades aceptables de las tres enzimas en un biocatalizador de 9 h de edad celular, da como resultado una capacidad desulfurante máxima; tal como se deduce del valor de X_{BDS}^2 alcanzado a ese tiempo, como se observa también en la Figura 4.12. Se puede decir que la máxima actividad intracelular para las enzimas monooxigenasas DszC y DszA se logra al emplear células de 23 h de tiempo de crecimiento, mientras que la mayor actividad desulfinasas, DszB, se presenta al utilizar un biocatalizador obtenido tras 5 h de crecimiento. Sin embargo los perfiles de actividad de estas enzimas hacen que los valores de actividades de las enzimas DszABC que presentan las células de 9 h, den como resultado una combinación adecuada que permite alcanzar una conversión alta de DBT en HBP.

A la vista de estos resultados, destacan dos edades celulares de entre los tiempos de crecimiento probados, 5 y 23 h, por los valores que presentan en las actividades de determinadas enzimas.

Así, en células de 5 horas de edad celular, la enzima DszC presenta valores razonablemente altos de actividad frente a DBT y DBTO. La enzima DszB muestra una actividad muy elevada, pero la proteína DszA no alcanza valores de actividad suficientemente elevados para que la capacidad desulfurante sea tan grande como la alcanzada al utilizar células de 9 h de tiempo de crecimiento.

Las células de 23 h de tiempo de crecimiento presentan las mejores actividades de las enzimas DszA y DszC. Sin embargo, la actividad de la desulfinasas DszB es muy baja. No pueden alcanzar valores de conversión como los que se logran con células de 9h. Es más, la caída tan drástica de actividad de la enzima DszB tras la mitad de la fase exponencial de crecimiento no permite obtener conversiones elevadas de DBT a HBP al emplear biocatalizadores de edades celulares superiores a las 9 ó 10 h de crecimiento.

Por el contrario, las células que se han crecido en el fermentador hasta las 9 h de edad, aunque no manifiestan la mayor actividad en la enzima DszA, ni la de la enzima DszB es muy elevada, en combinación con actividades relativamente altas de DszC frente a DBT y DBTO, permiten alcanzar conversiones altas de DBT.

A partir de este estudio intracelular de los perfiles de actividad de las enzimas implicadas en la ruta 4S es posible explicar el comportamiento de las células de *Pseudomonas putida* CECT5279 durante la desulfuración de DBT en condiciones de *resting cells*. Tal como se observa en la Figura 4.12, la máxima capacidad desulfurante que se presenta al emplear células alrededor de las 10 h de tiempo de crecimiento se puede justificar desde el punto de vista microscópico al conocer lo que sucede a nivel intracelular.

Como se ha comentado en este capítulo, la combinación adecuada de actividades de las tres enzimas implicadas en la ruta 4S explica que al utilizar células de alrededor de 9 h proporcione los mejores resultados en cuanto a la conversión de DBT en HBP, como se deduce de las Figura 4.12 (a) y (b).

Desde un punto de vista operacional, el empleo de células de 23 h, según la curva de crecimiento (Figura 4.12 (a)), podría ser ventajoso por la mayor concentración de biomasa que se puede obtener a ese tiempo, y que quizás compense la eficiencia de las células de 9 h. Podría ser otro motivo para combinar células de máxima actividad monooxigenasas y máxima actividad desulfinasas.

Los resultados obtenidos en este estudio abren la puerta a plantear mejoras en la forma de operar para la biodesulfuración de DBT con células de *Pseudomonas putida* CECT5279 como biocatalizador. En los siguientes capítulos, se muestra el trabajo realizado en el estudio de formas de operación en condiciones de *resting cells*. A raíz del diferente comportamiento de las enzimas de la ruta 4S a lo largo del tiempo de crecimiento, se plantean las siguientes formas de operación:

- Empleando células con máxima capacidad desulfurante; lo que significa utilizar células recogidas a las 9 h de crecimiento.
- Combinando células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento por sus respectivas máximas actividades monooxigenasa y desulfinasas, de dos maneras diferentes:
 - De forma secuencial
 - De manera simultánea.

5. DESARROLLO DE FORMAS DE OPERACIÓN PARA LA DESULFURACIÓN DE DBT

5 DESARROLLO DE FORMAS DE OPERACIÓN PARA LA DESULFURACIÓN DE DBT

El trabajo que se discute a lo largo del presente capítulo es consecuencia de las conclusiones alcanzadas a raíz del estudio mostrado en el Capítulo 4 de esta Memoria. En él, se ha realizado e interpretado la medida de las actividades intracelulares de las enzimas implicadas en la ruta 4S a lo largo del tiempo de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279. Estas medidas han permitido explicar el comportamiento que muestran las células de este microorganismo al desulfurar DBT en condiciones de *resting cells*, modificando la edad celular empleada. Los estudios preliminares que se muestran en el Capítulo 3 de la presente Memoria, llevaron a la realización de dichas medidas. Se puso de manifiesto que en condiciones de células en reposo, la mejor conversión de DBT en el compuesto libre de azufre, HBP, se logra al utilizar células de 9 h de tiempo de crecimiento; una edad celular que parece relativamente temprana para desarrollar la máxima capacidad desulfurante. En el citado Capítulo 4, se muestra la diferente evolución de las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S a medida que se emplean células de mayor edad. El distinto desarrollo de actividades de las enzimas, implicadas en la conversión de DBT en HBP al aumentar la edad celular, permite justificar este comportamiento en cuanto a dicha capacidad desulfurante. Mientras que las actividades de las enzimas monooxigenasas, que catalizan las tres primeras reacciones de la ruta 4S, aumentan hasta alcanzar un máximo hacia la mitad de la fase exponencial de crecimiento (alrededor de 23 h), la actividad de la enzima desulfinasas, que gobierna la última reacción de esta ruta, es máxima al principio de la fase exponencial de crecimiento (alrededor de 5 h). Las células de 9 h de edad presentan una combinación de actividades de las enzimas monooxigenasas, DszA y DszC, y de la enzima desulfinasas DszB que permite aventajar a las células de otras edades en su capacidad desulfurante.

Por un lado, las células de 9 h de tiempo de crecimiento suponen, hasta el momento, la mejor opción para desulfurar DBT en condiciones de *resting cells*; por este motivo se toman como una referencia y una posible forma de operación.

Por otro lado, los resultados que se obtienen al estudiar los perfiles de actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S hacen pensar en otras posibilidades. Por ejemplo, la utilización de células de 5 h de tiempo de crecimiento, por su máxima actividad desulfínasa DszB, y de células de 23 h de tiempo de crecimiento por presentar las mayores actividades de las enzimas monooxigenasas DszA y DszC. El empleo combinado de estos tipos de células se va a comparar con el uso de un solo tipo de células de máxima capacidad desulfurante, de 9 h de edad.

De esta manera, a lo largo del presente capítulo, se proponen diferentes formas de operar empleando células de *Pseudomonas putida* CECT5279 para desulfurar DBT en fase acuosa en condiciones de *resting cells*. Se van a emplear dos configuraciones que se denominaran en adelante como biocatalizadores simples y biocatalizadores compuestos según las siguientes descripciones.

La primera forma de operar que se aborda en este capítulo consiste en el empleo de células de una única edad celular, 9 h. Esto da lugar a lo que se ha decidido nombrar como “biocatalizador simple”, por estar formado solamente por células de este único tiempo de crecimiento, que hasta ahora presentan la mayor capacidad desulfurante, a tenor de los estudios reflejados en el Capítulo 4 de la presente Memoria. Se va a emplear como variable de estudio la concentración de biomasa de este biocatalizador simple, en la operación de *resting cells*.

En segundo lugar, se propone aprovechar las características que presentan por separado las células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento. Las células de 5 h destacan por presentar la mayor actividad de la enzima desulfínasa DszB y valores moderados de actividad de la enzima DszC frente a DBT y DBTO. Sin embargo, la actividad monooxigenasa DszA que tienen las células de esta edad es muy pequeña. Las células de 23 h de tiempo de crecimiento destacan por presentar la máxima actividad de las enzimas monooxigenasas DszC y DszA, aunque la actividad de la enzima desulfínasa es escasa. A raíz de esta situación, se plantea la posibilidad de combinar las dos edades de células, 5 y 23 h, a fin de mejorar la operación de desulfuración por sus respectivas altas actividades desulfínasa y monooxigenasa. Esta situación, en la presente Memoria, se va a denominar como “biocatalizador compuesto”, por combinar células de dos tiempos de crecimiento. De esta definición, surgen dos posibilidades para trabajar con biocatalizadores compuestos: por un lado, llevar a cabo la desulfuración mediante el empleo de dos biocatalizadores simples combinados de forma secuencial (constituidos

cada uno por células de dos tiempos de crecimiento, 5 y 23 h), y por otro lado, el uso de dos biocatalizadores simples de forma simultánea, en que el biocatalizador compuesto estará constituido por mezclas de células de estos dos tiempos de crecimiento.

De acuerdo con lo anterior, se ha decidido estudiar la eliminación de dibenzotiofeno, considerando estas diferentes formas de trabajo mediante el empleo, en condiciones de *resting cells*, bien de células de 9 h de tiempo de crecimiento, bien de combinaciones de células de 5 y 23 h. Dentro de esta segunda manera de operar, se plantean dos posibilidades: primero utilizar células de 23 h de edad y luego de 5 h de manera secuencial, o bien, mezclar de forma simultánea células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento.

5.1 Empleo de un biocatalizador simple

Aprovechando las características que presentan las células crecidas hasta las 9 h, se muestran en este apartado experimentos de eliminación de DBT en condiciones de *resting cells*, empleando este único tipo de células. Se pretende estudiar el uso de un biocatalizador simple, esto es formado por células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de una sola edad celular. Hasta el momento, el empleo de células de esta edad celular se ha hecho con una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L, lo que ha proporcionado el mejor resultado sobre otras edades probadas, gracias a los valores de actividades que presentan las enzimas de la ruta 4S a este tiempo.

En este apartado se busca estudiar la eficiencia de este biocatalizador simple. Para ello, se han obtenido células crecidas en fermentador hasta las 9 h, según el protocolo estandarizado que se describe en el Apartado 2.2.2.1 de la presente Memoria. Las células obtenidas se han empleado en ensayos de desulfuración en condiciones de reposo celular en un medio tamponado, tal como se describe en el Apartado 2.2.2.2 del mismo capítulo. En estos ensayos, se ha empleado DBT como sustrato azufrado en una concentración inicial de 25 μ M. La variable estudiada ha sido la concentración de biomasa empleada, que se ha variado entre 0,7 y 4,2 g peso seco/L, para comprobar el comportamiento de las células de esta edad y estudiar la formulación óptima de este biocatalizador simple, buscando la mayor conversión, en el menor tiempo y con la menor inversión de biomasa posible. El tiempo de ensayo fue de 180 minutos. En la Tabla 5.1 se muestra la planificación experimental para este estudio.

TABLA 5.1 - Diseño experimental para la desulfuración de DBT con células de 9 h de tiempo de crecimiento.

Código	C_X^9
	(g peso seco/L)
U-1	0,7
U-2	1,4
U-3	2,1
U-4	2,8
U-5	3,5
U-6	4,2

5.1.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación se recopilan los resultados de los experimentos en *resting cells* con estas células de 9 h, utilizando concentraciones de biomasa de 0,7 a 4,2 g peso seco/L. Estos resultados se obtuvieron a partir muestras tomadas a lo largo del tiempo. Las muestras se recogieron en tubo Eppendorf en acetonitrilo, se centrifugaron y acidificaron como se describe en el Apartado 2.2.2.2 de este trabajo. Se llevó a cabo su análisis empleando cromatografía HPLC, según la metodología que se describe en el Apartado 2.2.1.4. La evolución de la concentración de cada uno de los compuestos implicados en la ruta 4S a lo largo del tiempo de ensayo se recoge, para cada experimento, en las Tablas 5.2 a 5.7.

TABLA 5.2 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento U-1.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	22,16	1,13	0,00	0,00	0,00
15	19,21	2,60	0,67	0,00	0,00
30	15,40	3,88	2,41	0,00	0,66
45	12,40	4,01	4,87	0,62	1,74
60	10,01	3,98	8,38	1,38	2,03
90	5,55	3,43	11,53	3,23	2,95
120	2,31	1,51	10,72	5,39	4,15
150	0,92	0,69	8,53	10,13	5,28
180	0,32	0,61	5,37	13,28	5,45

TABLA 5.3 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento U-2.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	21,13	1,72	0,23	0,00	0,00
15	17,87	3,17	1,63	0,00	0,96
30	13,48	3,07	4,91	0,54	2,37
45	8,86	2,60	8,64	1,25	2,81
60	5,77	1,78	10,50	2,21	3,43
90	2,27	0,99	10,95	4,88	7,23
120	0,84	0,41	8,43	6,61	10,48
150	0,00	0,00	4,12	10,08	12,04
180	0,00	0,00	1,67	11,59	13,44

TABLA 5.4 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento U-3.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	19,01	2,22	0,43	0,00	0,64
15	12,99	3,41	2,36	0,38	2,33
30	8,46	2,94	6,69	0,93	5,19
45	4,44	1,78	10,97	1,21	7,99
60	1,40	0,66	12,34	1,55	9,91
90	0,00	0,00	10,75	2,04	14,04
120	0,00	0,00	6,45	2,68	16,78
150	0,00	0,00	2,58	3,34	19,88
180	0,00	0,00	0,74	4,22	20,91

TABLA 5.5 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento U-4.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	18,21	2,08	0,74	0,88	1,78
15	11,59	2,33	3,21	2,01	3,76
30	4,18	0,79	6,86	2,98	7,45
45	0,44	0,00	7,35	2,78	10,36
60	0,32	0,00	6,57	2,22	13,99
90	0,00	0,00	2,06	1,54	19,43
120	0,00	0,00	0,00	1,36	22,13
150	0,00	0,00	0,00	0,00	23,54
180	0,00	0,00	0,00	0,00	24,97

TABLA 5.6 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento U-5.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	16,93	1,98	0,58	0,65	1,70
15	7,06	2,05	3,89	3,00	5,46
30	2,55	0,51	8,44	3,83	9,67
45	0,79	0,00	5,77	5,29	13,16
60	0,00	0,00	2,93	5,00	17,06
90	0,00	0,00	0,00	3,92	21,08
120	0,00	0,00	0,00	1,37	23,63
150	0,00	0,00	0,00	0,12	24,88
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.7 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento U-6.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	15,40	3,11	1,19	0,27	2,26
15	4,89	1,02	3,72	2,55	8,22
30	0,62	0,00	2,64	4,46	14,25
45	0,00	0,00	0,00	5,06	19,81
60	0,00	0,00	0,00	3,52	23,15
90	0,00	0,00	0,00	0,00	24,54
120	0,00	0,00	0,00	0,00	24,83
150	0,00	0,00	0,00	0,00	24,97
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,01

5.1.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestra la comparación de la evolución de la concentración de DBT y HBP, respectivamente, para las seis concentraciones de células empleadas. Lógicamente, las velocidades de eliminación de DBT y de producción de HBP aumentan progresivamente al emplear una mayor concentración de biomasa. De acuerdo con esto, como se observa en las Tablas 5.2 a 5.7, la acumulación de los compuestos intermedios de la ruta 4S, DBTO, DBTO₂ y HBPS, es cada vez menor, y más breve en el tiempo, a medida que se emplea una concentración de biomasa mayor. Así, la desaparición completa de DBT y DBTO, los dos primeros compuestos de la ruta 4S, que no se produce a los 180 min al emplear 0,7 g peso seco/L, tiene lugar a 120 min al emplear 1,4 g peso seco/L, y llega a adelantarse a los 45 min en el caso de utilizar 4,2 g peso seco/L. De manera análoga sucede con DBTO₂, reduciéndose su tiempo de desaparición total a los 45 min al emplear 4,2 g peso seco/L en la formulación del biocatalizador. Sin embargo, el producto intermedio HBPS permanece después de los 60 min incluso con la concentración más alta de biomasa.

En la Figura 5.1 se muestra la evolución del sustrato azufrado de partida, DBT, a lo largo del tiempo, al emplear concentraciones crecientes de biomasa. En la citada figura se puede observar una mayor eliminación de este compuesto al emplear mayor concentración de catalizador de 9 h de tiempo de crecimiento, logrando así mejorar la velocidad de desaparición de DBT.

En la Figura 5.2 se refleja la evolución en la producción de HBP, al emplear diferentes concentraciones de biomasa de este biocatalizador de 9 h de tiempo de crecimiento. El empleo de una mayor cantidad de biocatalizador permite aumentar la conversión de DBT en HBP y reducir el tiempo necesario para conseguir la transformación de todo el compuesto de partida.

Para comentar con mayor profundidad estos resultados, se han empleado diferentes parámetros relacionados con la eficiencia del biocatalizador, es decir, dirigidos a comparar la conversión lograda con cada concentración de biomasa empleada, la velocidad de eliminación del sustrato de partida y el tiempo empleado. Estos parámetros se describen a continuación.

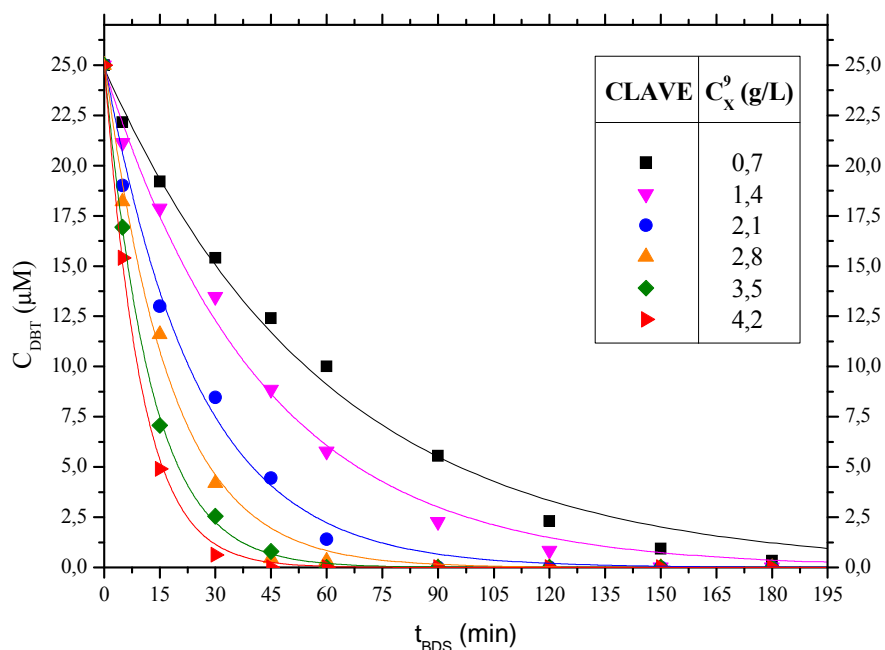


FIGURA 5.1 - Evolución de la concentración de DBT en condiciones de *resting cells* empleando células de 9h en concentraciones de 0,7 a 4,2 g/L.

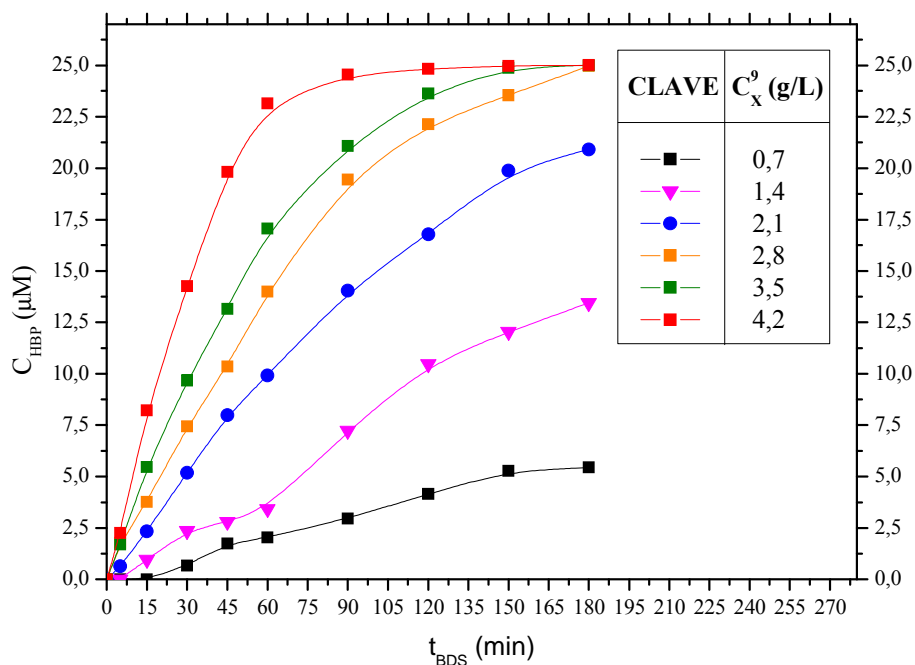


FIGURA 5.2 - Evolución de la concentración de HBP en condiciones de *resting cells* empleando 0,7 g/L de células de 9h en concentraciones de 0,7 a 4,2 g/L.

- **Grado de desulfuración máximo**

Este parámetro, $X_{BDS}^{máx}$, refleja la máxima capacidad desulfurante que manifiestan las células bajo las condiciones empleadas en el ensayo de desulfuración, cuyo procedimiento experimental se detalla en el Apartado 2.2.2.2 del Capítulo 2 de la presente Memoria. Relaciona la mayor concentración alcanzada en el compuesto final de la ruta, HBP, en el intervalo de 3 h empleadas en el ensayo de desulfuración, y la concentración inicial de sustrato azufrado de partida, DBT, de la forma que se muestra en la expresión [5.1].

$$X_{BDS}^{máx} = \frac{C_{HBP}^{máx}}{C_{DBT}^0} \cdot 100 \quad [5.1]$$

- **Tiempo necesario para alcanzar el grado de desulfuración máximo**

Se trata del tiempo necesario para alcanzar la máxima conversión de DBT en HBP dentro del tiempo de ensayo en estado de *resting cells*, según el procedimiento experimental descrito en el Apartado 2.2.2.2 del Capítulo 2. Se ha representado como

$$t_{BDS}^{X_{BDS}^{máx}}.$$

- **Velocidad inicial de eliminación de DBT**

Este parámetro, R_{DBT}^0 , definido por la expresión [3.2] en el Capítulo 3 de la presente Memoria, muestra la capacidad de eliminación inicial del sustrato de partida, DBT, que presentan las células en las condiciones del ensayo de desulfuración.

$$R_{DBT}^0 = - \left. \frac{dC_{DBT}}{dt} \right|_{t=0} \quad [5.2]$$

- **Productividad máxima**

La productividad máxima, $P_{BDS}^{máx}$, muestra la máxima conversión alcanzada referida al tiempo necesario para alcanzar dicho valor de capacidad desulfurante máxima en un experimento. Relaciona el grado de desulfuración máximo y el tiempo empleado para alcanzar dicha conversión máxima, tal como se muestra en la siguiente expresión:

$$P_{BDS}^{máx} = \frac{X_{BDS}^{máx}}{t_{BDS}^{X_{BDS}^{máx}}} \quad [5.3]$$

- **Mejora en la velocidad inicial de eliminación de DBT**

La mejora en la velocidad de eliminación de DBT, ΔR_{DBT}^0 , se define como se muestra en la expresión [5.4]. Se emplea para conocer la mejora en la velocidad inicial de eliminación de DBT al utilizar diferentes concentraciones de biomasa. Se considera una concentración de referencia, que coincide con la más baja empleada, 0,7 g peso seco/L, para comparar los resultados obtenidos al utilizar otras concentraciones de células.

$$\Delta R_{DBT}^0 (0,7 - C_X) = \frac{R_{DBT}^0(C_X) - R_{DBT}^0(0,7)}{R_{DBT}^0(0,7)} \quad [5.4]$$

De esta manera, se puede comparar la variación que se genera en este parámetro, R_{DBT}^0 , al pasar de una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L a otras concentraciones mayores.

- **Mejora en la productividad máxima**

De forma análoga, se ha definido un segundo parámetro de mejora, ΔP_{BDS}^{max} , para estudiar cómo afecta el aumento en la concentración de biomasa sobre la productividad máxima, P_{BDS}^{max} . De esta manera, la mejora en la productividad máxima al aumentar la concentración con respecto a un valor de referencia de 0,7 g peso seco/L, se define como se muestra a continuación.

$$\Delta P_{BDS}^{max} (0,7 - C_X) = \frac{P_{BDS}^{max}(C_X) - P_{BDS}^{max}(0,7)}{P_{BDS}^{max}(0,7)} \quad [5.5]$$

En la Tabla 5.8 se muestran los parámetros obtenidos para cada concentración de biomasa empleada en los experimentos realizados. Se ha comparado el máximo grado de desulfuración, X_{BDS}^{max} , expresado según la ecuación [5.1], el tiempo necesario para alcanzar esa conversión máxima, $t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$, y la velocidad inicial de eliminación de DBT, R_{DBT}^0 , expresada según la ecuación [3.2] en el Capítulo 3 de la presente Memoria. Para conocer el efecto que tiene el aumento de la concentración de biomasa en la conversión lograda por unidad de tiempo, se muestran, además, los valores de productividad máxima P_{BDS}^{max} , definida en la expresión [5.3], para conocer si se consigue o no un empleo eficiente de las células. Así, en la citada tabla, se observa un aumento

progresivo en el grado de desulfuración conforme se emplea una mayor concentración de células. De esta manera, se logra, al emplear concentraciones de biomasa superiores a 2,8 g peso seco/L, no sólo la conversión completa de DBT a HBP, sino también, la reducción del tiempo de operación para lograr dicha conversión. Se puede observar que existe un aumento casi proporcional a la concentración de biomasa en la velocidad inicial de desaparición del sustrato de partida. A pesar de obtenerse una mejor desulfuración a medida que se emplea mayor cantidad de biocatalizador, desde el punto de vista de la eficiencia, no parece interesante emplear grandes cantidades de biomasa. El aumento logrado en la velocidad de desaparición de DBT es prácticamente proporcional al aumento en la concentración de biomasa. Sin embargo, a pesar de las elevadas conversiones conseguidas, este aumento de biomasa no consigue reducir sustancialmente el tiempo necesario para alcanzar dicha conversión.

En cuanto a la productividad máxima, los valores recogidos en la Tabla 5.8 muestran un aumento proporcional a medida que se utiliza una mayor concentración celular. Sin embargo, a partir de concentraciones de 3,5 g peso seco /L no se obtienen mejores resultados, tal como se comentó previamente. El mayor valor alcanzado en la productividad máxima es de 0,667 %/min al emplear una concentración de 3,5 g peso seco/L.

Asimismo, para conocer el efecto del aumento en la concentración de biomasa, en la Figura 5.3 se han representado los valores de los parámetros de mejora en la velocidad inicial de eliminación de DBT, ΔR_{DBT}^0 , definida por la ecuación [5.3], y en la mejora en la productividad, ΔP_{BDS}^{max} , definida por la expresión [5.4].

TABLA 5.8 - Parámetros obtenidos para los experimentos de desulfuración de DBT en condiciones de *resting cells* empleando células de 9 h de tiempo de crecimiento en concentraciones de 0,7 a 4,2 g/L.

C_X^9	X_{BDS}^{max}	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$	R_{DBT}^0	P_{BDS}^{max}
(g peso seco/L)	(%)	(min)	($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).	(%/min)
0,7	21,80	180	0,417	0,121
1,4	53,76	180	0,584	0,299
2,1	83,64	180	1,022	0,465
2,8	99,88	180	1,443	0,555
3,5	100,00	150	2,023	0,667
4,2	100,00	150	2,603	0,667

En la citada figura se puede ver este efecto en la variación de la productividad máxima obtenida y la velocidad inicial de eliminación de DBT, que provoca el paso de una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L, empleada como referencia, a 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 y 4,2 g/L. La tendencia general de este parámetro es a aumentar de manera proporcional con la concentración de biomasa. Si bien, la mejora en la productividad máxima no aumenta al pasar de 3,5 a 4,2 g peso seco/L de concentración de biomasa. No se obtiene ninguna variación al seguir aumentando la concentración celular. La actividad de la enzima monooxigenasa DszA es moderada en estas células, y la actividad desulfinasas es muy reducida. Trabajar con elevadas concentraciones de biomasa no logra mejoras proporcionales a la cantidad de biomasa empleada. Por otro lado, la mejora en la velocidad de eliminación de DBT es prácticamente proporcional al aumento en la concentración de biomasa, lo que está de acuerdo con la elevada actividad de la enzima monooxigenasa DszC; se llega a alcanzar valores de 2,603 $\mu\text{mol/L/min}$. Mientras que la capacidad inicial de eliminación de DBT es un aspecto importante en el biocatalizador, la productividad alcanzada es más importante. Así el máximo valor en la productividad máxima, alcanzado al utilizar 3,5 g peso seco/L, es significativo, y muestra que no compensa emplear concentraciones de biomasa por encima de dicho valor.

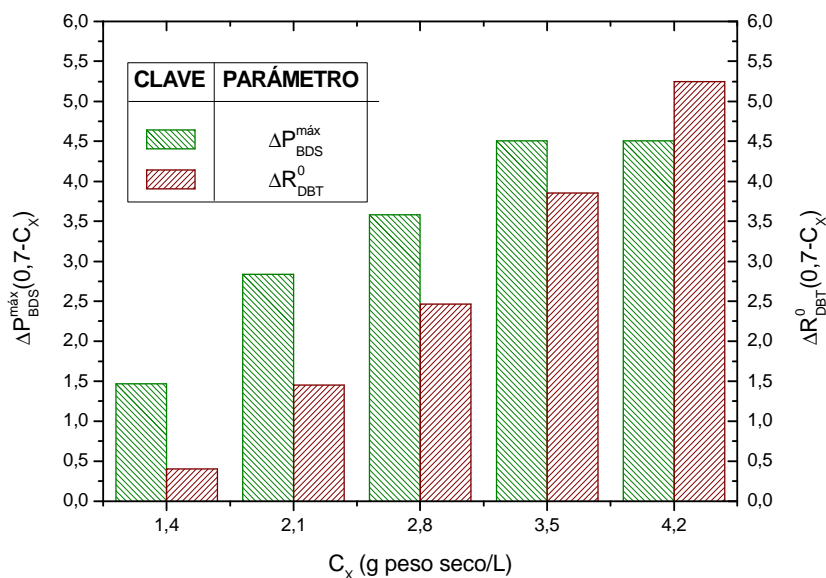


FIGURA 5.3 - Mejora en la productividad máxima y mejora en la velocidad inicial de eliminación de DBT al cambiar la concentración de biomasa de 0,7 a 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 y 4,2.

Como conclusión, se puede decir que las células de 9 h presentan mayor capacidad desulfurante a medida que aumenta la concentración de células empleada. El aumento de biomasa proporciona, por tanto, una mayor eliminación del compuesto de partida, DBT (superando los 2,5 $\mu\text{mol/L/min}$), una mayor conversión, a través de la ruta 4S, en HBP (lográndose la transformación del 100% del DBT empleado), y la reducción el tiempo de operación. Sin embargo, la eficiencia en la operación no mejora al utilizar concentraciones de biomasa muy elevada, al no producirse una reducción del tiempo de operación proporcional al aumento de biomasa, cuando se emplean concentraciones de 3,5 y 4,2 g peso seco/L.

Desde el punto de vista de los valores de actividad medido, tal como se concluyó en el Capítulo 4 de esta Memoria, las células de 9 h de tiempo de crecimiento poseen una actividad monooxigenasa DszC moderadamente alta (1,455 $\mu\text{mol/g/min}$ frente a DBT y 1,492 $\mu\text{mol/g/min}$ frente a DBTO). Sin embargo, las actividades de las enzimas DszA y DszB son bastante bajas (0,379 y 0,157 $\mu\text{mol/g/min}$, respectivamente), lo que puede explicar que a elevadas concentraciones de biomasa no se alcancen mejoras proporcionales al aumento de biomasa en la reducción en el tiempo de operación.

Los biocatalizadores formulados sólo con células de 9 h constituyen, hasta el momento, la mejor opción para la desulfuración de DBT. En los siguientes apartados se estudiará la aplicación de biocatalizadores compuestos formulados a partir de células de *P. putida* CECT5279 de 5 y 23 h de edad.

5.2 Empleo de biocatalizadores compuestos

En base a las medidas de actividad realizadas en el Capítulo 4 de la presente Memoria, surgió la posibilidad de desulfurar DBT en fase acuosa y en condiciones de *resting cells*, empleando células de dos tiempos de crecimiento: 5 y 23 h. Las células de 5 h de tiempo de crecimiento presentan la mayor actividad en la enzima desulfinaasa DszB, que cataliza la última reacción en serie de la ruta 4S, mientras que las células de 23 h de edad muestran la mayor actividad para las enzimas monooxigenasas DszA y DszC, que gobiernan las tres primeras reacciones de la misma ruta. Por estos motivos, se pueden plantear nuevas formas de trabajar en condiciones de células en reposo, empleando células de 5 y 23 h para aprovechar sus respectivas capacidades, y de esta manera, mejorar la velocidad y calidad de desulfuración que permiten las células de 9 h.

En este apartado se aborda el estudio del empleo de biocatalizadores compuestos formados por células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento. Para ello, se proponen dos formas de operación para la eliminación de DBT en fase acuosa mediante el empleo de estas edades celulares. Para conocer si existe una mejora en la eficiencia de la desulfuración, se emplean las células de 9 h de edad como referencia, en condiciones análogas.

La primera parte de este estudio consiste en evaluar una forma de trabajar basada en dos etapas de tratamiento, una con cada tipo de células. Se emplean, por tanto, dos biocatalizadores simples en serie; primero con células de 23 h, que llevarían a cabo, preferentemente, las tres primeras reacciones de la ruta 4S, y, después, con células de 5 h, por su alta actividad desufinasa y capacidad para llevar a cabo la última reacción de la ruta 4S. De esta manera, en cada etapa se emplean células caracterizadas por realizar mejor una parte de la ruta 4S. Los compuestos que permanezcan en el medio tras la acción de unas células servirán de sustrato a las otras, que finalizarán el proceso de desulfuración. Se han utilizado diferentes concentraciones de biomasa para cada una de las edades celulares, que se combinan en las dos etapas citadas.

En una segunda parte, se aborda el estudio de otra forma de operación para desulfurar DBT en que se trabaja simultáneamente con ambas edades celulares. Se trata de un biocatalizador formado por una mezcla de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento. Se combinan diferentes proporciones de cada tipo de células en distintas concentraciones totales de biomasa; se pretende conseguir que las células de 5 y de 23 h actúen al mismo tiempo para ayudar a la transformación de DBT en HBP de manera más eficiente.

El objetivo, en ambos estudios, empleando una operación secuencial o simultánea, es buscar la forma de operar más adecuada para lograr la mayor velocidad de desaparición de DBT, su conversión a HBP en el menor tiempo posible y con el menor empleo posible de biomasa.

5.2.1 OPERACIÓN SECUENCIAL

Como se ha comentado previamente, a raíz de los resultados obtenidos con células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento en la medida de actividades intracelulares de las enzimas de la ruta 4S que se muestra a lo largo del Capítulo 4 de la presente

Memoria, se plantea como forma de operación para la eliminación de DBT, el empleo de dos etapas en serie, empleando en una primera etapa un biocatalizador formado por células de 23 h y en la segunda etapa un biocatalizador formado por células de 5 h de *Pseudomonas putida* CECT5279.

Para llevar a cabo esta experimentación, las células que forman parte de los biocatalizadores se han obtenido a partir de un crecimiento en fermentador según el procedimiento estandarizado que se describe en el Apartado 2.2.2.1 de la presente Memoria, a tiempos de crecimiento de 5 y 23 h. La metodología experimental se basa en dos ensayos sucesivos en condiciones de *resting cells*, tal como se describe en el Apartado 2.2.2.2 de esta Memoria, con las salvedades que se explican a continuación. En este grupo de experimentos, en el primero de estos dos ensayos sucesivos de desulfuración, se empleó un volumen de 20 mL de tampón biológico HEPES en vez de 16 mL en previsión de las posibles pérdidas de volumen durante el muestreo y la operación intermedia de separación, antes de la segunda etapa. De igual manera que en los experimentos con células de 9 h, la concentración inicial de DBT fue en todos los casos de 25 μ M. Se añadió la cantidad necesaria de células crecidas hasta 23 h para tener la concentración deseada de biomasa en cada caso. Se dejó evolucionar el sistema bajo agitación a 250 rpm y a una temperatura controlada de 30 °C durante 180 min. Durante este tiempo, se tomaron muestras a diferentes intervalos sobre acetonitrilo, según se explica en el mismo Apartado 2.2.2.2. Después de este tiempo, se centrifugó el caldo a 9000 rpm durante 9 min para desechar las células empleadas en la primera etapa. Se tomaron 16 mL del caldo y se añadió la cantidad de células de 5 h de edad necesaria para tener la concentración de biomasa deseada. El sistema evolucionó en las mismas condiciones que en la primera etapa, con una velocidad de agitación de 250 rpm y a 30°C de temperatura, durante otros 180 min. En esta segunda etapa, lógicamente, no se añadió ningún sustrato azufrado nuevo. Tal como se hizo en la primera etapa, se tomaron muestras a lo largo de diferentes intervalos sobre acetonitrilo, según la misma metodología.

Se combinaron estas dos etapas con células de 23 y 5 h, respectivamente, trabajando con concentraciones de biomasa de ambos tiempos de crecimiento de 0,7; 1,4 y 2,1 g peso seco/L. Las diferentes combinaciones propuestas en la planificación experimental, se muestran en la Tabla 5.9; se han probado en total nueve combinaciones de células de ambos tiempos de crecimiento.

TABLA 5.9 - Planificación experimental para el estudio de la desulfuración de DBT con células de dos tiempos de crecimiento de manera secuencial.

Código	C_X^{5h}	C_X^{23h}
	(g peso seco/L)	(g peso seco/L)
S-1	0,7	0,7
S-2	0,7	1,4
S-3	0,7	2,1
S-4	1,4	0,7
S-5	1,4	1,4
S-6	1,4	2,1
S-7	2,1	0,7
S-8	2,1	1,4
S-9	2,1	2,1

5.2.1.1 Resultados experimentales

Como se ha explicado en el punto anterior, se trata de experimentos desarrollados en dos etapas para aprovechar las características de los dos tipos de células (Calzada y col., 2009). En todos los casos, se ha empleado una concentración inicial de DBT 25 μ M en tampón HEPES, que se puso en contacto con la concentración elegida de células de 23 horas de edad en cada caso. El tiempo total de muestreo fue de 360 min, 180 min por cada etapa.

Las muestras que se tomaron durante cada etapa se analizaron mediante cromatografía de HPLC según la metodología que se describe en el Apartado 2.2.1.4 del Capítulo 2 de la presente Memoria. Como resultado de este análisis, se obtuvieron los valores de concentración para cada uno de los compuestos implicados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) a lo largo del tiempo de ensayo.

En las Tablas 5.10 a 5.18 se muestran los valores de concentración obtenidos a lo largo del tiempo para cada uno de los compuestos de la ruta 4S en los experimentos realizados. Los datos recogidos entre tiempos 0 y 180 min corresponden a concentraciones medidas a lo largo de la primera etapa de desulfuración empleando el biocatalizador de 23 h de tiempo de crecimiento. Los datos obtenidos entre tiempos 195 y 360 min conciernen a resultados obtenidos a lo largo de la segunda etapa en que se utiliza el biocatalizador de 5 h de edad celular.

TABLA 5.10 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-1.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	19,80	3,32	0,71	0,78	0,24
30	13,29	4,74	2,82	1,48	0,57
45	10,57	4,65	5,24	2,16	1,00
60	7,64	3,84	7,06	2,94	1,35
90	3,15	3,30	8,91	4,63	1,88
120	1,30	2,11	7,88	6,18	2,53
150	0,43	0,62	5,75	8,79	2,88
180	0,00	0,29	3,47	10,49	3,21
195	0,00	0,00	2,10	9,02	5,23
210	0,00	0,00	1,36	8,35	7,35
225	0,00	0,00	0,94	8,01	8,29
240	0,00	0,00	0,57	7,61	10,00
270	0,00	0,00	0,25	7,43	11,76
300	0,00	0,00	0,00	7,23	12,57
330	0,00	0,00	0,00	7,22	13,79
360	0,00	0,00	0,00	7,12	13,98

TABLA 5.11 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-2.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	14,58	4,66	1,99	1,13	3,41
30	7,50	3,54	7,48	3,18	4,53
45	2,34	2,57	9,97	3,73	8,12
60	0,00	0,00	8,90	5,49	12,46
90	0,00	0,00	4,13	6,14	16,86
120	0,00	0,00	1,13	6,16	19,73
150	0,00	0,00	0,00	5,56	21,82
180	0,00	0,00	0,00	3,64	23,00
195	0,00	0,00	0,00	3,12	23,05
210	0,00	0,00	0,00	2,23	23,15
225	0,00	0,00	0,00	2,12	23,20
240	0,00	0,00	0,00	1,10	23,53
270	0,00	0,00	0,00	1,22	23,88
300	0,00	0,00	0,00	1,12	23,86
330	0,00	0,00	0,00	1,02	23,94
360	0,00	0,00	0,00	0,49	24,32

TABLA 5.12 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-3.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	5,44	2,88	2,24	1,25	11,66
30	0,58	0,68	1,18	1,77	19,29
45	0,00	0,00	0,00	2,38	23,64
60	0,00	0,00	0,00	0,74	24,22
90	0,00	0,00	0,00	0,00	24,35
120	0,00	0,00	0,00	0,00	24,77
150	0,00	0,00	0,00	0,00	24,97
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
210	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
225	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
240	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
270	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
300	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
330	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.13 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-4.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	20,00	4,12	0,85	0,78	0,24
30	15,79	5,54	3,38	1,48	0,57
45	12,42	6,00	6,29	2,16	1,00
60	9,65	5,67	8,47	2,94	1,35
90	4,30	4,32	10,69	4,63	1,88
120	1,57	2,87	9,46	6,18	2,53
150	0,49	1,91	6,55	8,79	2,88
180	0,00	1,37	3,52	10,49	3,21
195	0,00	0,00	2,10	9,71	5,23
210	0,00	0,00	1,63	8,94	7,81
225	0,00	0,00	1,13	7,54	10,25
240	0,00	0,00	0,68	6,89	13,23
270	0,00	0,00	0,30	5,07	17,00
300	0,00	0,00	0,00	3,64	18,71
330	0,00	0,00	0,00	3,64	19,93
360	0,00	0,00	0,00	3,06	20,93

TABLA 5.14 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-5.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	15,88	3,09	2,62	0,98	3,22
30	5,08	1,97	3,10	3,48	5,76
45	1,35	0,47	3,06	4,10	8,74
60	0,21	0,00	0,99	4,32	13,55
90	0,00	0,00	0,00	3,19	17,33
120	0,00	0,00	0,00	2,94	20,05
150	0,00	0,00	0,00	3,32	22,06
180	0,00	0,00	0,00	1,18	23,50
195	0,00	0,00	0,00	0,70	23,70
210	0,00	0,00	0,00	0,10	24,30
225	0,00	0,00	0,00	0,00	24,90
240	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
270	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
300	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
330	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.15 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-6.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	5,44	2,88	2,24	1,25	11,66
30	0,58	0,68	1,18	1,77	19,29
45	0,00	0,00	0,00	2,38	23,64
60	0,00	0,00	0,00	0,74	24,22
90	0,00	0,00	0,00	0,00	24,35
120	0,00	0,00	0,00	0,00	24,77
150	0,00	0,00	0,00	0,00	24,97
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
210	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
225	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
240	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
270	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
300	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
330	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.16 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-7.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	15,30	4,04	0,48	0,80	0,24
30	12,85	5,53	1,89	1,77	0,57
45	9,23	5,87	3,63	2,23	1,00
60	8,26	5,25	5,88	3,14	1,35
90	3,70	4,04	9,62	4,77	1,88
120	1,49	2,71	11,31	7,12	2,53
150	0,54	1,95	10,68	8,79	2,88
180	0,00	1,09	7,01	10,01	3,21
195	0,00	0,00	3,99	8,49	7,90
210	0,00	0,00	0,00	6,76	13,75
225	0,00	0,00	0,00	5,29	16,81
240	0,00	0,00	0,00	4,39	18,01
270	0,00	0,00	0,00	2,51	21,78
300	0,00	0,00	0,00	1,52	23,01
330	0,00	0,00	0,00	1,00	24,33
360	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.17 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-8.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	13,60	2,61	2,20	1,15	3,13
30	5,88	1,48	2,70	1,87	5,23
45	2,91	0,78	2,00	1,77	8,55
60	1,22	0,00	0,95	2,20	13,05
90	0,43	0,00	0,00	1,37	16,33
120	0,00	0,00	0,00	1,15	19,50
150	0,00	0,00	0,00	0,92	22,23
180	0,00	0,00	0,00	0,00	23,75
195	0,00	0,00	0,00	0,00	24,70
210	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
225	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
240	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
270	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
300	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
330	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.18 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento S-9.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	5,44	2,88	2,24	1,25	11,66
30	0,58	0,68	1,18	1,77	19,29
45	0,00	0,00	0,00	2,38	23,64
60	0,00	0,00	0,00	0,74	24,22
90	0,00	0,00	0,00	0,00	24,35
120	0,00	0,00	0,00	0,00	24,77
150	0,00	0,00	0,00	0,00	24,97
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
210	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
225	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
240	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
270	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
300	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
330	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

5.2.1.2 Interpretación de los resultados experimentales

Se va a estudiar la evolución de la concentración de los compuestos implicados en la ruta 4S a lo largo del tiempo de cada ensayo de desulfuración que se muestra en la planificación experimental de la Tabla 5.9. Por otro lado, se compararán estos resultados al emplear diferentes concentraciones de biomasa en ambos biocatalizadores de 23 y 5 h de tiempo de crecimiento. Asimismo, se analizan los resultados de dichos experimentos empleando parámetros definidos anteriormente como el grado de desulfuración máximo, $X_{BDS}^{máx}$, definido en la expresión [5.1] y el tiempo necesario para alcanza la máxima conversión de DBT en HBP, $t_{BDS}^{X_{BDS}^{máx}}$, en cada experimento propuesto. Además, se ha empleado un tercer parámetro, la velocidad inicial de eliminación de DBT, R_{DBT}^0 , definida en la expresión [3.2] del Capítulo 3 de la presente Memoria, para poner de manifiesto la capacidad de las células de 23 h en la primera etapa, para llevar a cabo la eliminación de DBT por su elevada actividad en la enzima monooxigenasa DszC, en comparación con las células de 9 h de edad.

En las Figuras 5.4 a 5.12 se compara la influencia de la concentración de biomasa empleada en cada etapa en la evolución de los compuestos de la ruta 4S con las diferentes combinaciones de células.

En la Figura 5.4 se compara la evolución de la concentración de DBT para los ensayos con las diferentes combinaciones de 23 y 5 h de tiempo de crecimiento. En dicha figura se puede observar que, en todos los casos, se logra la eliminación total de DBT en el tiempo establecido de ensayo en la primera etapa con células de 23 h de edad, independientemente de la concentración de biomasa empleada para células de este tiempo de crecimiento. Esto está de acuerdo con la elevada actividad de la enzima monooxigenasas DszC que presenta *Pseudomonas putida* a esta edad celular. Se demuestra, por tanto, la elevada capacidad de las células de la primera etapa para llevar a cabo la primera reacción de la ruta 4S. Asimismo, se observa que, a medida que se emplea una concentración de biomasa mayor, se acelera la eliminación del sustrato azufrado, como cabía esperar.

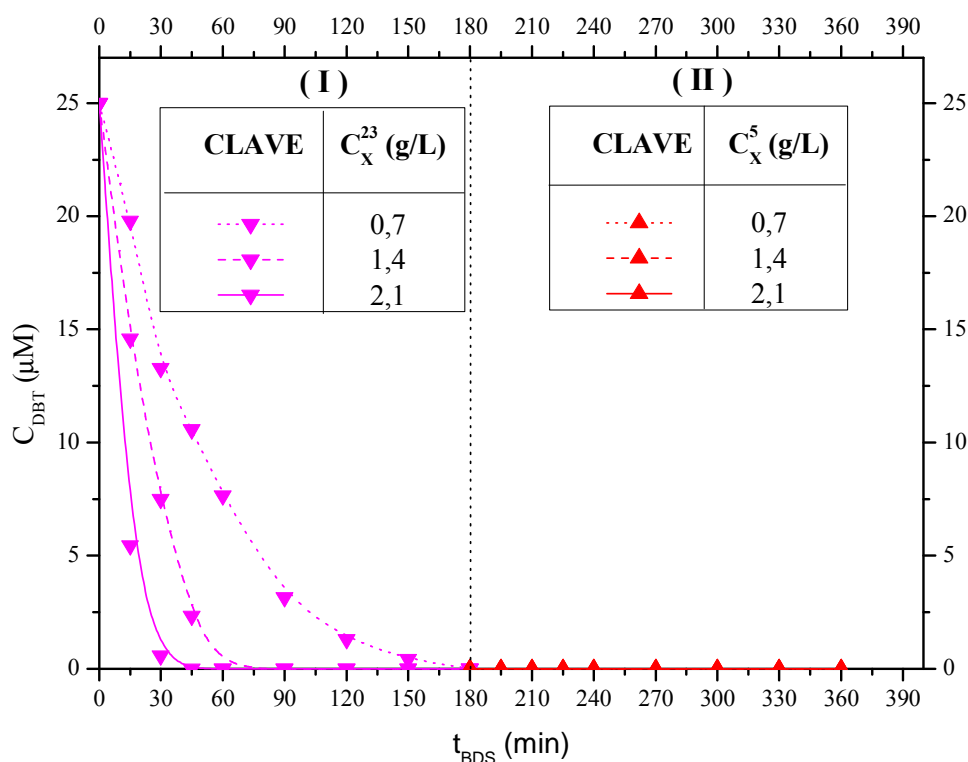


FIGURA 5.4 - Comparación de la evolución de la concentración de DBT combinando de manera secuencial células de 23 (I) y 5 h de edad (II).

La Figura 5.5 refleja la evolución del compuesto DBTO a lo largo del tiempo de ensayo en las diferentes combinaciones de biomasa de células de 23 y 5 h de edad. De manera análoga al caso anterior, en la primera etapa de esta forma de operación, se consigue eliminar prácticamente de forma total el intermedio DBTO gracias a la alta efectividad que presentan las células de 23 h para llevar a cabo las dos reacciones de la ruta 4S controladas por la enzima DszC. La acumulación de DBTO es cada vez menor y más breve a medida que se emplea una concentración mayor de biomasa en la primera etapa. En el caso de emplear una concentración de 0,7 g peso seco/L, aún queda alrededor de 1 μM DBT al comenzar la segunda etapa con células de 5 h de tiempo de crecimiento. La actividad que presentan las células de 23 h en la enzima DszC frente a DBTO (1,685 $\mu mol/L/min$) es ligeramente menor a la que muestran frente a DBT (1,821 $\mu mol/L/min$), como se observa al comparar las Figuras 5.4 y 5.5. Las células de 5 h eliminan finalmente el DBTO gracias a la actividad de la enzima DszC que presentan (1,330 $\mu mol/L/min$).

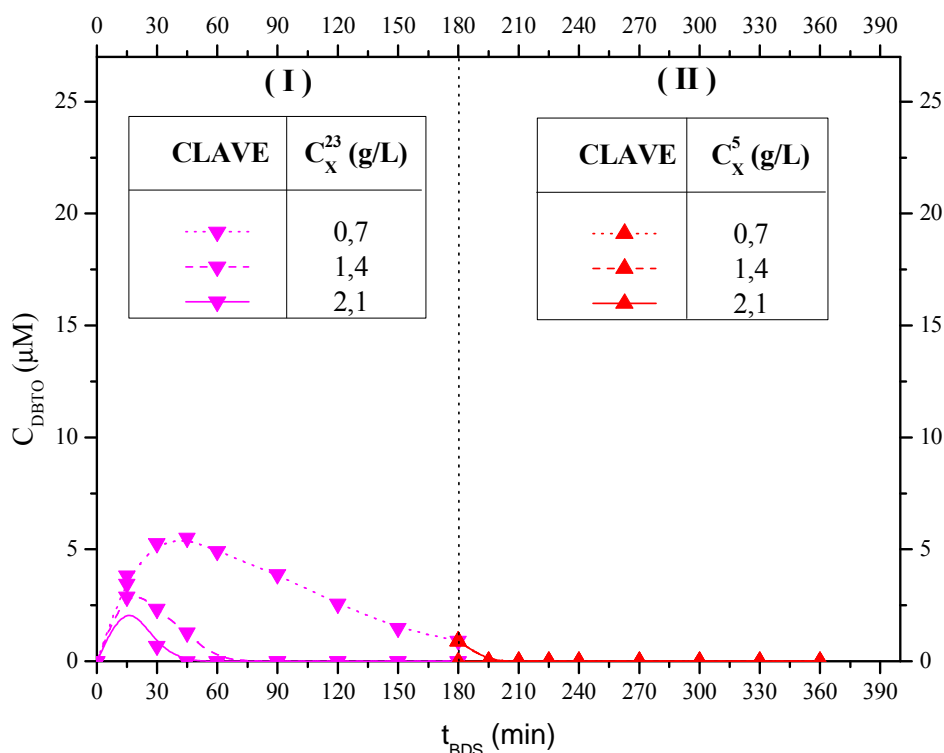


FIGURA 5.5 - Comparación de la evolución de la concentración de DBTO combinando de manera secuencial células de 23 (I) y 5 h de edad (II).

En la Figura 5.6 se compara la evolución del intermedio $DBTO_2$ al utilizar diferentes combinaciones de biomasa de células de 23 y 5 h de edad. En la primera etapa con células de 23 h, la concentración de $DBTO_2$ evoluciona de forma parecida al caso de DBTO. Las células de 23 h presentan la mayor actividad en la enzima DszA. Sin embargo, el valor de actividad de la enzima DszA no es tan elevado como el de la monooxigenasa DszC en esta edad celular, por lo que la acumulación de este compuesto intermedio es mayor y más prolongada en el tiempo. Es más, en el caso de utilizar la menor de las concentraciones de biomasa de células de 23 h en esta primera etapa, no se consigue la desaparición total de $DBTO_2$ en el tiempo del ensayo, quedando una concentración alrededor de 3 μM al comenzar la segunda etapa con células de 5 h. A pesar de la baja actividad de la enzima DszA en las células de 5 h de tiempo de crecimiento, se logra eliminar la concentración que aún queda de $DBTO_2$ en un tiempo comprendido entre 30 y 90 min en función de la concentración empleada tras una primera etapa en la que las células de 23 h no pudieron eliminarlo completamente.

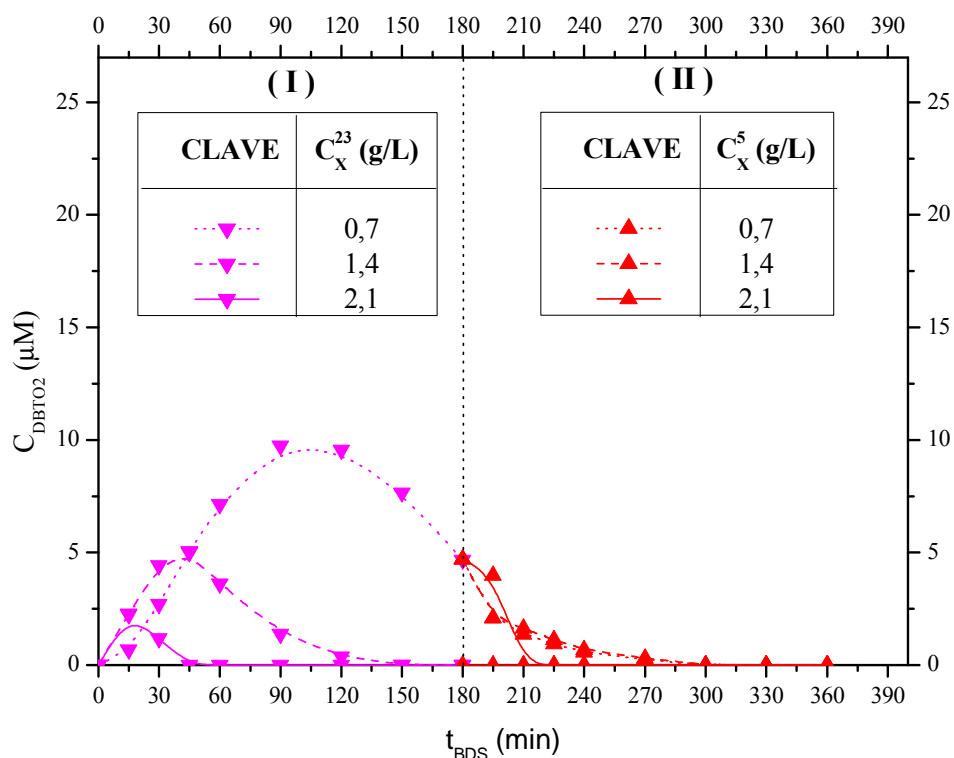


FIGURA 5.6 - Comparación de la evolución de la concentración de DBTO₂ en combinaciones secuenciales de células de 23 (I) y 5 h de edad (II).

En la Figura 5.7 se representa la evolución del compuesto HBPS al emplear una concentración de células de 23 h de 0,7 g peso seco/L en la primera etapa del proceso, y la evolución en la segunda etapa al emplear tres concentraciones diferentes de biomasa de células de 5 h. Con la primera etapa, este intermedio mantiene una evolución creciente, no alcanza ningún máximo, a causa de la baja actividad de la enzima DszB en las células de esta edad. Por el contrario, en la segunda etapa se refleja un cambio brusco de comportamiento, con una evolución opuesta al emplear células de 5 h de tiempo de crecimiento, por su máxima actividad desulfinasas. En esta segunda etapa se aprecia el efecto que causa el aumento de biomasa, acelerando notablemente la eliminación de este compuesto. Es destacable que, cuando se emplea una concentración de 2,1 g peso seco/L, se alcanza la transformación completa de HBPS en el tiempo de ensayo, lo que no es habitual en los trabajos previos de la literatura (Soleimani y col., 2007; Caro y col., 2007; 2007b y 2008).

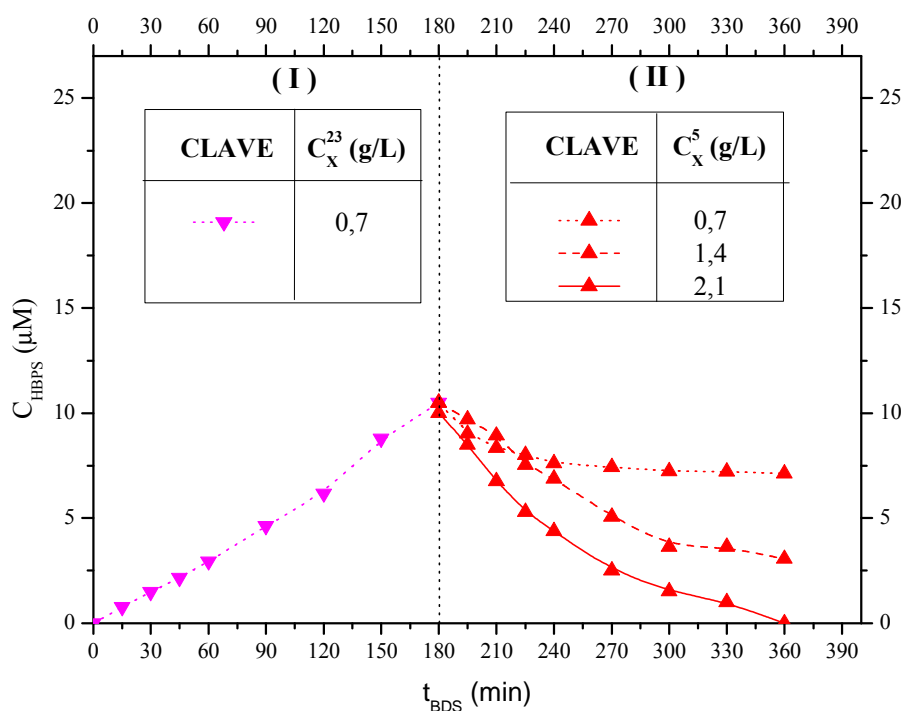


FIGURA 5.7 - Comparación de la evolución de la concentración de HBPS combinando de manera secuencial células de 23 h (I) en 0,7 g peso seco/L y células de 5 h de edad (II) en concentraciones de 0,7 a 2,1 g peso seco/L.

En la Figura 5.8 se representa la evolución de HBPS al utilizar una concentración de biomasa de 1,4 g peso seco/L en la primera etapa del proceso, y tres concentraciones de biomasa diferentes en la segunda etapa. A diferencia con el caso mostrado en la Figura 5.7, en que la concentración celular en la primera etapa es de 0,7 g peso seco/L, la evolución de HBPS alcanza un máximo, experimenta un descenso, a causa del empleo de mayor cantidad de biomasa, que compensa la baja actividad en la enzima DszB en las células de esta edad. De igual manera que en el caso anterior, las células de 5 h de tiempo de crecimiento logran eliminar este compuesto gracias a su elevada actividad en la misma enzima, observándose además el efecto del aumento en la concentración de biomasa en esta etapa. La eliminación de HBPS es completa en esta segunda etapa, salvo al emplear la menor de las concentraciones celulares (0,7 g/L).

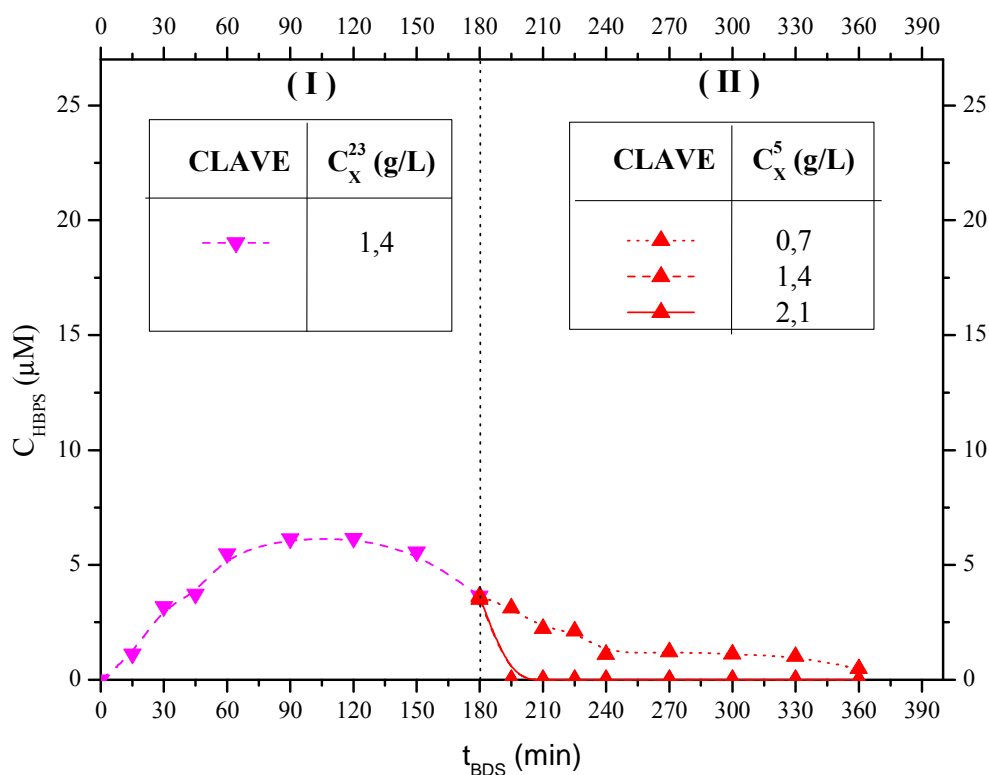


FIGURA 5.8 - Comparación de la evolución de la concentración de HBPS combinando de manera secuencial células de 23 h (I) en 1,4 g peso seco/L y células de 5 h de edad (II) en concentraciones de 0,7 a 2,1 g peso seco/L.

La Figura 5.9 muestra un comportamiento diferente en la evolución de HBPS, al emplear la mayor de las concentraciones de biomasa en la primera etapa. Al utilizar una concentración de biomasa de 2,1 g peso seco/L en las células de 23 h, se compensa, como se ha comentado también en el caso anterior, la baja actividad de la enzima DszB con la elevada concentración de células empleada. Así, el HBPS deja de detectarse a partir de los 90 min de tiempo de ensayo. La segunda etapa, con células de 5 h de tiempo de crecimiento pierde su sentido en este caso. La conversión completa de DBT en HBP se alcanza con el empleo de células de 23 h.

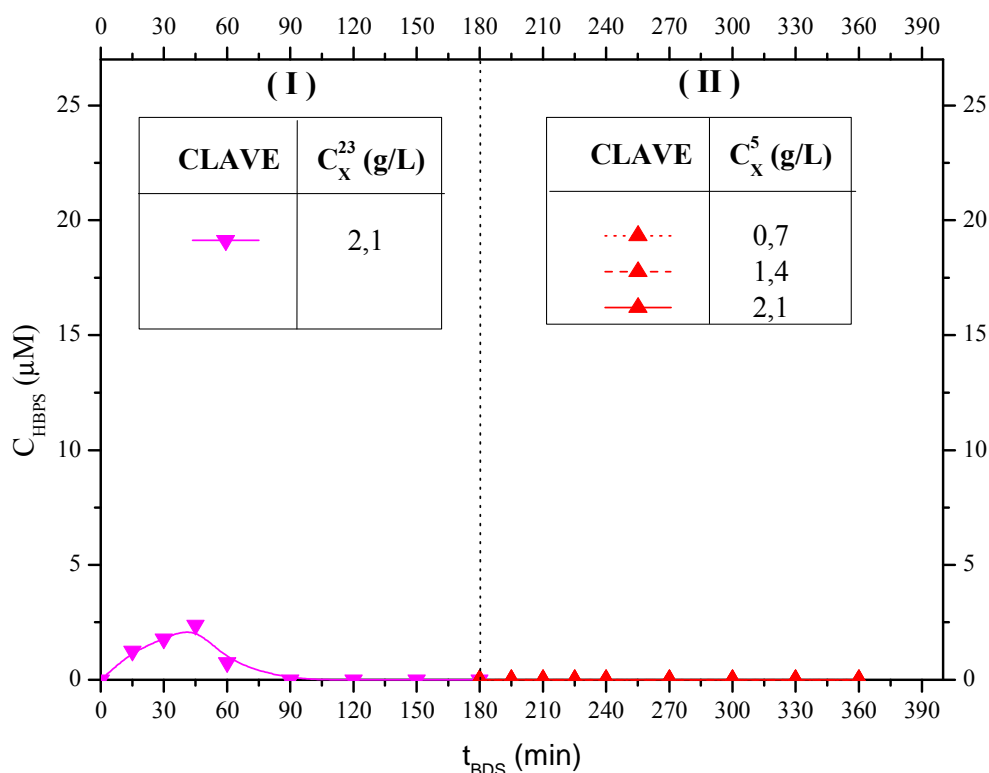


FIGURA 5.9 - Comparación de la evolución de la concentración de HBPS combinando de manera secuencial células de 23 h (I) en concentración de 2,1 g peso seco /L y células de 5 h de edad (II) en concentraciones de 0,7 a 2,1 g peso seco/L.

La evolución del compuesto final, HBP, al emplear una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L en la etapa con el biocatalizador de 23 h y diferentes concentraciones de biomasa en el biocatalizador de 5 h de tiempo de crecimiento, se muestra en la Figura 5.10 en el caso de emplear una concentración de 0,7 g peso seco/L en la primera etapa. La baja actividad de la enzima desulfinaasa DszB y el empleo de la menor de las concentraciones de biomasa probadas con células de 23 h hacen que sólo se alcance una conversión de DBT en HBP alrededor del 13%. Por el contrario, en la segunda etapa se refleja la elevada actividad de esta enzima en las células de 5 h, al lograr conversiones del 55,92, 83,72 y 100 % cuando se utilizan concentraciones de biomasa de 0,7; 1,4 y 2,1 g peso seco/L, respectivamente, debido a la eliminación de HBPS acumulado en la etapa anterior.

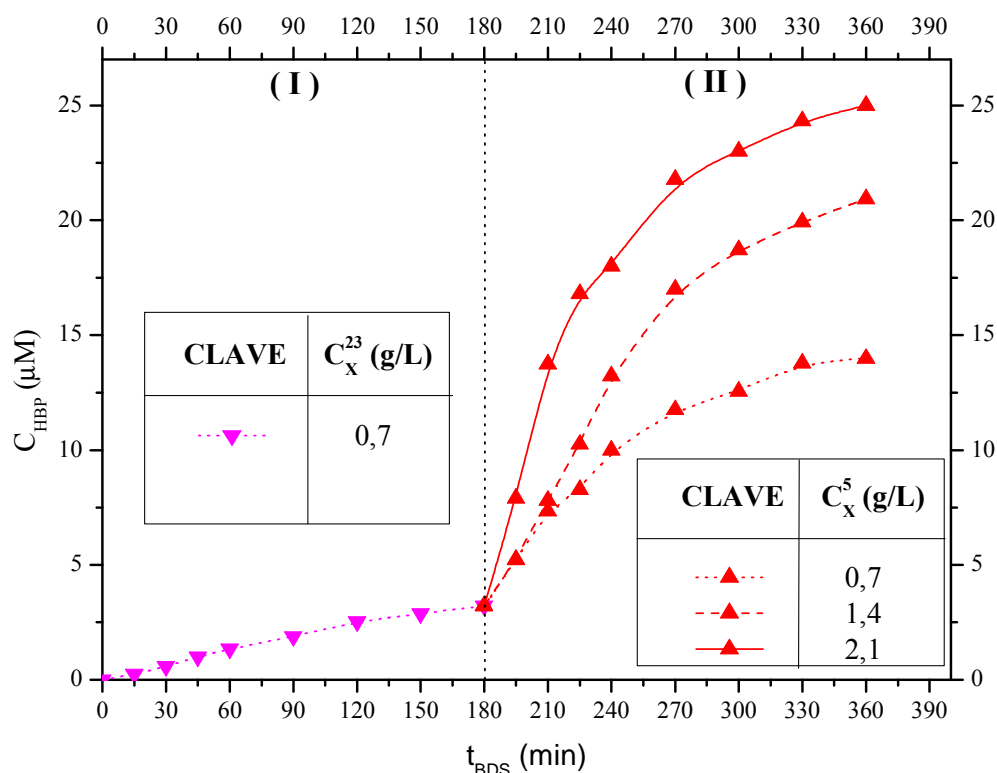


FIGURA 5.10 - Comparación de la evolución de la concentración de HBP combinando de manera secuencial células de 23 h (I) en concentración de 0,7 g peso seco/L y células de 5 h de edad (II) en concentraciones de 0,7 a 2,1 g peso seco/L.

En la Figura 5.11 se muestra la evolución de HBP al combinar una primera etapa con células de 23 h en una concentración de 1,4 g peso seco/L y una segunda etapa con células de 5 h en tres concentraciones diferentes de biomasa. En la primera etapa se logra una conversión de DBT en HBP alrededor del 92%; la concentración de biomasa empleada compensa la baja actividad de la enzima desulfinasa y quizás, si se hubiera prolongado la primera etapa, se hubiera alcanzado la conversión total en un tiempo no muy elevado. Gracias a la segunda etapa, y a la elevada capacidad desulfinasa de las células de 5 h se alcanza prácticamente en todos los casos la conversión total. Al emplear la menor de las concentraciones, 0,7 g peso seco/L se alcanza un grado de desulfuración del 97,28%.

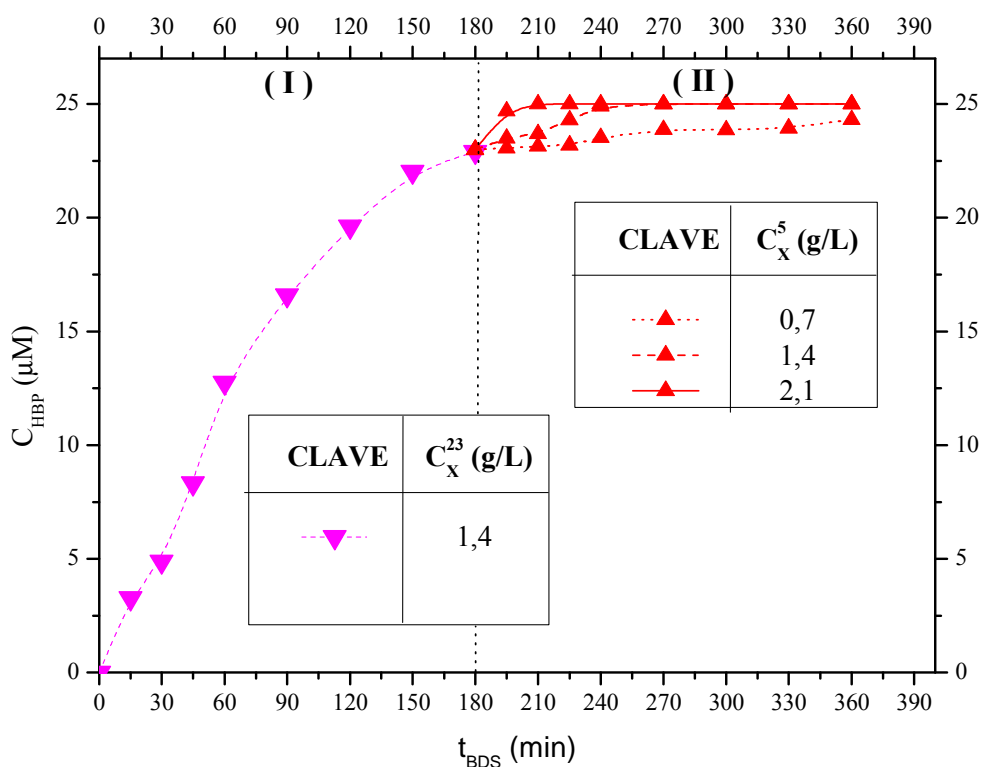


FIGURA 5.11 - Comparación de la evolución de la concentración de HBP combinando de manera secuencial células de 23 h (I) en concentración de 1,4 g peso seco/L y células de 5 h de edad (II) en concentraciones de 0,7 a 2,1 g peso seco/L.

En la Figura 5.12 se muestra la evolución de HBP a lo largo del tiempo cuando se emplea una concentración de biomasa de 2,1 g peso seco/L en la primera etapa con células de 23 h. La conversión de DBT en HBP es completa en esta primera etapa, con lo que no es necesario el empleo de una segunda etapa, como ya se había comentado anteriormente, al observar la evolución de la concentración del intermedio HBPS en la Figura 5.9.

Finamente, en la Tabla 5.19 se recogen los valores obtenidos para el grado de desulfuración máximo alcanzado, $X_{BDS}^{m\acute{a}x}$, el tiempo necesario para alcanzar esa máxima conversión, $t_{BDS}^{X_{BDS}^{m\acute{a}x}}$, y la velocidad inicial de eliminación calculada en la primera etapa de los experimentos, comentados en el presente apartado, en función de la concentración de biomasa empleada para las células de cada etapa.

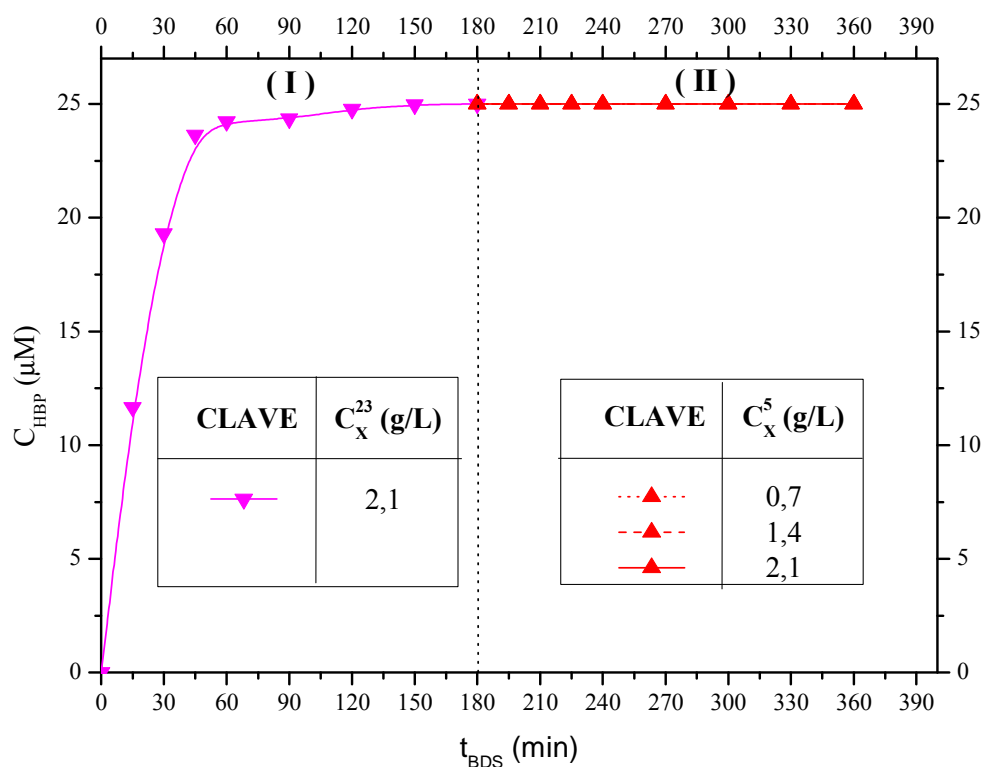


FIGURA 5.12 - Comparación de la evolución de la concentración de HBP combinando de manera secuencial células de 23 h (I) en concentración de 2,1 g peso seco/L y células de 5 h de edad (II) en concentraciones de 0,7 a 2,1 g peso seco/L.

TABLA 5.19 - Parámetros obtenidos para los experimentos de desulfuración de DBT en combinación secuencial de células de 23 y 5 h de tiempo de crecimiento.

C_X^{23}	C_X^5	C_X^T	$X_{BDS}^{máx}$	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{máx}}$	R_{DBT}^0
(g peso seco/L)	(g peso seco/L)	(g peso seco/L)	(%)	(min)	($\mu mol/L \cdot min$).
0,7	0,7	1,4	55,92	360	0,475 ^(**)
0,7	1,4	2,1	83,72	360	
0,7	2,1	2,8	100,00	360	
1,4	0,7	2,1	97,28	360	1,206 ^(**)
1,4	1,4	2,8	100,00	240	
1,4	2,1	3,5	100,00	210	
2,1	0,7 ^(*)	2,8	100,00	180	1,638 ^(**)
2,1	1,4 ^(*)	3,5	100,00	180	
2,1	2,1 ^(*)	4,2	100,00	180	

^(*) Las células de 23 h de tiempo de crecimiento lograron la conversión total durante la primera etapa

^(**) Se refiere al valor calculado con los datos de evolución de DBT en la primera etapa

En la Tabla 5.19 se observa la progresiva mejora en el grado de desulfuración máximo obtenido a medida que se emplean mayores concentraciones de biomasa total. Al comparar los resultados de experimentos realizados, a una concentración de células de 23 h constante, se pone claramente de manifiesto la importancia de las células de 5 h, que por su alta actividad en la enzima desulfinaasa DszB, permiten mejores resultados cuando se aumenta la concentración de biomasa empleada en la segunda etapa, reduciendo el tiempo de operación y favoreciendo notablemente la mayor conversión de DBT a HBP. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta la cantidad de biomasa invertida de cada tipo de células, se observa que es más eficiente el empleo de una concentración mayor en la primera etapa que en la segunda. Así, para una concentración total de biomasa constante (por ejemplo 2,1 g peso seco/L), los resultados en la capacidad desulfurante, conversión y tiempo de operación son mejores cuando se emplea $C_X^{23} = 1,4$ y $C_X^5 = 0,7$, que al emplear $C_X^{23} = 0,7$ y $C_X^5 = 1,4$. Igual que sucede al comparar el resto de experimentos en que se emplea la misma concentración total de biomasa. De esta manera, se refleja la importancia de la primera etapa para llevar a cabo las tres primeras reacciones de la ruta 4S, para que pueda producirse la conversión adecuada de DBT a HBP a través de la cuarta reacción.

Desde el punto de vista de la eliminación del sustrato de partida, la velocidad inicial de eliminación de DBT aumenta, como cabe esperar, al trabajar con mayores concentraciones de biomasa de células de 23 h en la primera etapa, tal y como se muestra en la citada Tabla 5.19.

En los experimentos cuyos resultados se dan en las Tablas 5.10 y 5.13 no se logra la conversión completa del sustrato azufrado en HBP. En dichos experimentos se emplea una concentración de células de 23 h de 0,7 g peso seco/L. Al aumentar la concentración de células en la primera etapa, mejora considerablemente la conversión a HBP. Hasta tal punto que, en todos los experimentos llevados a cabo con células de 23 h de edad en concentración de 2,1 g peso seco/L, se logra la conversión del 100 % sin que sea necesaria la segunda etapa, tal como se refleja en la Figura 5.12.

En las Figuras 5.7, 5.8 y 5.9 se muestra la evolución del intermedio HBPS al emplear en la primera etapa con células de 23 h, concentraciones de 0,7; 1,4 y 2,1 g peso seco/L, respectivamente. En ellas se refleja la influencia de la concentración de células de 5 h de edad en la eliminación del penúltimo compuesto de la ruta 4S, HBPS. Se puede apreciar también, sobre todo en la Figura 5.7, la mayor actividad desulfinaasa

DszB que presentan las células de 5 h sobre las de 23 h de tiempo de crecimiento. El aumento en la concentración de biomasa en la segunda etapa de esta forma de operación permite acelerar sustancialmente la desaparición de HBPS. En las Figuras 5.8 y 5.9 se manifiesta la actividad de la enzima desulfínasa DszB que, aunque escasa, presentan las células de 23 h en la primera etapa y compensa el empleo de mayores concentraciones de biomasa.

A la vista de estos resultados, la operación realizada en dos etapas funciona como se esperaba. En la primera etapa se logra la desaparición de los tres primeros compuestos involucrados en la ruta 4S, mostrando la capacidad de estas células para llevar a cabo esta parte de la desulfuración de DBT mediante la ruta 4S, como se muestra particularmente en las Figuras 5.4, 5.5 y 5.6. Las células de 5 h de tiempo de crecimiento son capaces de completar la acción realizada por las de mayor edad. Se ha demostrado la posibilidad de trabajar de manera secuencial con células de *Pseudomonas putida* CECT5279, en etapas separadas gracias a su diferente perfil de actividad enzimático, lo que puede tener aplicación en una futura operación industrial, aunque dependiendo de diversos aspectos. Las células de 23 h de tiempo de crecimiento son capaces de llevar a cabo, fundamentalmente, las primeras etapas de la ruta 4S, para transformar DBT en HBPS. A continuación, las células de 5 h de edad, por su elevada actividad desulfínasa DszB, muestran su aptitud para finalizar la transformación de HBPS en HBP. La eficiencia de esta forma de operación parece menor que las otras en que sólo se realiza una etapa de desulfuración en condiciones de *resting cells*. Se han necesitado concentraciones de biomasa y tiempos de operación elevados.

En estos ensayos, se ha fijado el tiempo de cada etapa en 180 min. Aunque se demuestra el funcionamiento de esta forma de operar en dos fases, para convertir DBT en HBP, los tiempos de operación son prolongados. Por este motivo, fundamentalmente, no se logra una mejora sustancial con respecto a la operación empleando un solo tipo de células, que se muestra en el Apartado 5.2. Sobre todo desde el punto de vista del tiempo y la concentración de biomasa empleados, que se recogen en la Tabla 5.19.

Una recomendación, a la hora de utilizar esta forma de operación, consistiría en completar este estudio y utilizar como una variable más, a optimizar, el tiempo de la primera etapa con células de 23 h de edad. De esta manera se mejoraría esta operación. Como ejemplo, observando la evolución de la concentración de HBP a lo largo de los experimento S-2, S-5 y S-8, en que se emplea una concentración de células de 23 h de

1,4 g peso seco/L, cuyos resultados se recogen en las Tablas 5.10, 5.13 y 5.16, se podría realizar el cambio de células a los 80-90 min. De esta manera, una concentración aceptable de células de 5 h de edad podría seguramente lograr la conversión completa del DBT de partida en un tiempo razonable.

Por otro lado, esta forma de operación requiere el empleo de una etapa de centrifugación. Se trata, por tanto, de una operación de separación adicional a las otras formas de operación propuestas, y un tiempo de parada en la operación. Aunque esta parada se lleva a cabo de manera bastante sencilla a nivel de laboratorio, de cara a una posible aplicación industrial, podría suponer un aspecto negativo para el proceso, no sólo desde el punto de vista técnico, sino también económico.

En el apartado siguiente se va a trabajar con células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento de manera simultánea en la misma y única operación en condiciones de *resting cells*. Se pretende comprobar la capacidad de actuar en el mismo medio células de diferente edad, para conocer si existe algún tipo de interacción que favorezca la transformación de DBT en HBP, y así comprobar si aventaja o no a la combinación secuencial de estas células.

5.2.2 OPERACIÓN SIMULTÁNEA

En el apartado anterior, se ha mostrado la posibilidad de trabajar en dos etapas en serie para desulfurar dibenzotiofeno, aprovechando las diferentes características que presentan las células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento. Aunque esa forma de operación puede presentar interés (dependiendo de la manera en que se decida llevar a cabo la operación industrial), cabe destacar que son necesarios tiempos elevados de operación y concentraciones de biocatalizador elevadas para lograr una desulfuración adecuada. Por otro lado, la necesidad de una etapa intermedia de separación entre las dos fases de desulfuración hace menos atractiva esta forma de operar.

Por estos motivos, en el presente apartado se aborda una segunda forma de operación combinando células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento. En este caso, se va a estudiar la posibilidad de desulfurar el mismo sustrato azufrado, DBT, combinando de manera simultánea estos dos tipos de células. Se intentará, por tanto, aprovechar las diferentes actividades de las enzimas de la ruta 4S que muestran las células de una y otra edad para lograr una desulfuración eficiente de DBT en un mismo biocatalizador.

En este apartado, se estudia la desulfuración de DBT empleando diferentes mezclas de células de 5 y 23 h de edad. Las variables que se han considerado son la cantidad total de biomasa empleada y la composición relativa de la mezcla de células de ambos tiempos de crecimiento. Se trata de buscar una formulación adecuada para desulfurar DBT en fase acuosa de la forma más eficiente posible, para lo cual se emplearán los parámetros previamente definidos para realizar una comparación cuantitativa de los resultados obtenidos a partir de las diversas posibilidades que las variables estudiadas en este apartado proporcionan. Para la formulación de los diferentes biocatalizadores compuestos probados en este estudio, se han obtenido células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento a partir de un cultivo en biorreactor según el protocolo estandarizado que se describe en el Apartado 2.2.2.1 del Capítulo 2 de esta Memoria. Se han llevado a cabo ensayos de desulfuración según la metodología descrita en el Apartado 2.2.2.2 del mismo Capítulo 2, teniendo en cuenta que se han empleado, a la vez, estos dos tipos de células. La planificación experimental consta de 22 experimentos que se resumen en la Tabla 5.20, como se puede apreciar, se cubren concentraciones totales de biomasa entre 0,7 y 4,2 g peso seco/L.

La **fracción másica de células de 23 h de tiempo de crecimiento**, Y^{23} es la variable que se ha definido para expresar la composición relativa del biocatalizador formado por células de ambas edades celulares; relaciona la concentración de biomasa de células de 23 h de tiempo de crecimiento con la concentración total de biomasa según la expresión [5.5].

$$Y^{23} = \frac{C_X^{23}}{C_X^5 + C_X^{23}} = \frac{C_X^{23}}{C_X^{5+23}} \quad [5.6]$$

De esta manera, en las figuras que se muestran a lo largo del presente apartado, cada experimento de la planificación mostrada en la Tabla 5.20, está representado por los valores de dos variables, la concentración total de biomasa, C_X^{5+23} , y la fracción másica de células de 23 h, Y^{23} .

En todos los experimentos realizados, se ha empleado una concentración inicial de DBT de 25 μ M, y se combinaron diferentes cantidades de biomasa de células de 5 y 23 h, variando no sólo la concentración total de biomasa, sino también, la proporción de células de cada tiempo de crecimiento, como se ha comentado previamente, y queda recogido en la Tabla 5.20.

A lo largo de cada uno de estos experimentos se tomaron muestras a diferentes tiempos, según la metodología que se describe en el Apartado 2.2.2.2 del Capítulo 2 de esta Memoria. Estas muestras se analizaron mediante cromatografía de HPLC bajo las condiciones de operación, hasta un tiempo máximo de ensayo de 180 minutos, y según el método experimental que se muestra en el Apartado 2.2.1.4 del mismo Capítulo 2.

TABLA 5.20 - Planificación experimental para la desulfuración de DBT con células de dos tiempos de crecimiento de manera simultánea.

Código	C_X^5	C_X^{23}	C_X^{5+23}	Y^{23}
	(g peso seco/L)	(g peso seco/L)	(g peso seco/L)	
M-1	0,70	0,00	0,70	0,00
M-2	0,35	0,35	0,70	0,50
M-3	0,00	0,70	0,70	1,00
M-4	1,40	0,00	1,40	0,00
M-5	0,70	0,70	1,40	0,50
M-6	0,00	1,40	1,40	1,00
M-7	2,10	0,00	2,10	0,00
M-8	1,40	0,70	2,10	0,33
M-9	0,70	1,40	2,10	0,67
M-10	0,00	2,10	2,10	1,00
M-11	2,80	0,00	2,80	0,00
M-12	2,10	0,70	2,80	0,25
M-13	1,40	1,40	2,80	0,50
M-14	0,70	2,10	2,80	0,75
M-15	0,00	2,80	2,80	1,00
M-16	3,50	0,00	3,50	0,00
M-17	2,10	1,40	3,50	0,40
M-18	1,40	2,10	3,50	0,60
M-19	0,00	3,50	3,50	1,00
M-20	4,20	0,00	4,20	0,00
M-21	2,10	2,10	4,20	0,50
M-22	0,00	4,20	4,20	1,00

5.2.2.1 Resultados experimentales

En las Tablas 5.21 a 5.42 se recogen los resultados para los experimentos enumerados en la Tabla 5.20. Para cada uno de ellos, se presenta la evolución de la concentración de los compuestos implicados en la ruta 4S a lo largo del tiempo de ensayo.

TABLA 5.21 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-1

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	22,01	1,68	1,21	0,00	0,05
30	19,80	3,18	2,13	0,00	0,28
45	18,62	3,65	2,56	0,00	0,67
60	17,76	3,96	2,79	0,00	1,13
90	15,57	4,31	3,65	0,43	1,89
120	13,07	4,30	3,97	0,83	2,68
150	11,09	4,24	4,80	1,27	3,39
180	9,10	4,20	5,00	2,13	3,76

TABLA 5.22 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-2.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	23,00	0,51	0,00	0,00	0,00
15	18,25	3,28	1,56	0,00	1,05
30	13,1	3,79	3,94	0,52	2,76
45	6,89	2,39	8,56	1,21	4,52
60	3,69	1,24	10,82	1,49	5,46
90	0,47	0,64	11,57	2,72	6,71
120	0,00	0,00	7,97	3,83	8,01
150	0,00	0,00	3,59	5,03	8,79
180	0,00	0,00	0,89	5,89	9,22

TABLA 5.23 -Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-3.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	24,02	1,96	0,00	0,00	0,05
10	22,03	2,93	0,00	0,27	0,10
15	20,00	3,52	0,48	0,78	0,24
30	15,79	4,35	1,89	1,48	0,57
45	12,42	4,32	3,63	2,16	1,00
60	9,65	4,23	5,88	2,94	1,35
90	4,30	4,02	9,62	4,63	1,88
120	1,57	2,88	11,31	6,18	2,53
150	0,49	1,91	10,68	8,79	2,88
180	0,00	1,37	9,61	10,49	3,21

TABLA 5.24 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-4.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	19,99	2,84	0,55	0,30	0,52
30	15,85	3,99	3,21	0,46	1,87
45	11,85	4,36	5,32	0,37	2,68
60	9,40	4,26	6,89	0,73	3,90
90	6,42	3,57	8,77	0,89	5,23
120	4,40	2,56	9,47	1,58	6,90
150	2,65	1,95	8,83	3,75	8,12
180	1,59	1,32	6,96	5,50	9,02

TABLA 5.25 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-5.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	12,67	3,72	4,19	0,84	2,77
30	2,26	4,23	10,63	3,53	4,31
45	0,32	2,35	8,33	7,12	5,90
60	0,00	0,59	4,70	9,34	8,09
90	0,00	0,00	0,76	12,75	11,12
120	0,00	0,00	0,00	10,57	13,74
150	0,00	0,00	0,00	9,26	16,44
180	0,00	0,00	0,00	6,51	19,11

TABLA 5.26 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-6.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	13,88	2,11	2,62	0,98	5,28
30	5,08	1,97	4,12	3,48	10,77
45	1,35	0,47	3,24	4,10	15,00
60	0,21	0,00	0,99	4,32	19,01
90	0,00	0,00	0,00	3,19	22,15
120	0,00	0,00	0,00	2,94	24,00
150	0,00	0,00	0,00	3,32	24,00
180	0,00	0,00	0,00	1,18	24,00

TABLA 5.27 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-7.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	15,77	3,21	1,66	0,66	3,01
30	8,17	3,25	6,35	0,75	5,89
45	5,00	1,90	10,12	0,41	6,96
60	1,85	0,77	12,64	0,48	8,55
90	0,00	0,00	12,55	0,70	11,55
120	0,00	0,00	9,98	1,16	14,91
150	0,00	0,00	6,15	1,50	17,54
180	0,00	0,00	2,75	1,60	20,42

TABLA 5.28 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-8

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	13,07	3,56	3,54	0,69	4,14
30	5,16	1,70	7,03	1,61	9,72
45	0,87	0,00	7,59	2,28	15,57
60	0,00	0,00	4,23	1,97	20,05
90	0,00	0,00	0,52	0,94	23,92
120	0,00	0,00	0,00	0,00	24,49
150	0,00	0,00	0,00	0,00	24,62
180	0,00	0,00	0,00	0,00	24,44

TABLA 5.29 _ Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-9.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	10,80	2,77	2,66	0,89	5,34
30	2,39	0,81	6,70	2,81	12,00
45	0,00	0,00	2,72	3,52	19,27
60	0,00	0,00	0,00	2,76	22,32
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.30 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-10.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	11,78	2,49	2,39	1,42	12,13
30	2,27	0,63	0,94	1,66	19,71
45	0,43	0,00	0,25	2,07	22,53
60	0,00	0,00	0,00	1,70	23,54
90	0,00	0,00	0,00	0,95	23,50
120	0,00	0,00	0,00	0,00	24,35
150	0,00	0,00	0,00	0,00	24,23
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.31 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-11.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	21,97	1,98	0,74	0,00	0,23
15	12,88	3,21	4,00	0,00	3,25
30	4,35	2,67	9,57	0,00	7,54
45	0,00	0,70	12,18	0,00	11,76
60	0,00	0,00	9,81	0,20	15,13
90	0,00	0,00	3,19	2,44	18,89
120	0,00	0,00	1,21	0,77	22,38
150	0,00	0,00	0,50	0,00	24,60
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.32 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-12.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4,52	2,50	6,16	1,97	10,33
30	0,00	0,60	2,47	1,53	20,46
45	0,00	0,00	0,43	1,09	24,01
60	0,00	0,00	0,00	0,66	24,53
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.33 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-13.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4,39	3,28	6,36	2,68	7,33
30	0,00	0,99	5,98	2,12	16,13
45	0,00	0,00	3,82	3,38	18,00
60	0,00	0,00	0,00	3,13	22,70
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.34 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-14.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	3,88	1,35	4,68	1,38	11,05
30	0,00	0,00	2,76	2,80	18,68
45	0,00	0,00	0,00	1,36	23,52
60	0,00	0,00	0,00	0,00	24,88
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.35 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-15.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	17,51	1,22	2,21	0,75	3,40
10	10,06	1,02	3,11	1,68	9,76
15	3,31	0,36	1,65	2,66	17,20
30	1,12	0,00	0,00	2,72	21,43
45	0,22	0,00	0,00	1,29	23,17
60	0,00	0,00	0,00	0,68	24,43
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.36 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-16.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	18,66	4,35	1,29	0,00	0,00
15	5,01	5,21	6,23	1,35	6,82
30	0,00	0,00	11,05	0,79	12,34
45	0,00	0,00	7,70	0,41	16,94
60	0,00	0,00	1,97	0,93	21,43
90	0,00	0,00	0,00	0,50	24,70
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.37 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-17.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	3,85	0,68	2,36	2,20	15,40
30	0,64	0,00	0,00	0,98	24,04
45	0,00	0,00	0,00	0,50	24,75
60	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.38 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-18.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	2,16	0,80	4,90	1,61	12,24
30	0,00	0,00	0,00	5,89	18,64
45	0,00	0,00	0,00	1,02	22,53
60	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.39 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-19.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	15,00	1,62	5,99	0,57	0,27
15	5,24	0,88	7,01	2,10	10,74
30	0,86	0,00	0,25	3,75	20,60
45	0,00	0,00	0,00	1,71	23,14
60	0,00	0,00	0,00	0,82	24,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.40 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-20.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	12,56	4,19	2,57	0,50	6,24
15	4,48	2,99	6,10	2,00	11,15
30	0,00	0,00	6,98	1,43	16,52
45	0,00	0,00	3,57	0,70	20,54
60	0,00	0,00	0,00	0,50	22,71
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.41 - Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M- 21.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	1,80	2,14	2,05	1,66	15,97
30	0,00	0,00	0,23	1,10	23,82
45	0,00	0,00	0,15	1,07	24,30
60	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 5.42 -Resultados obtenidos de la evolución de los compuestos de la ruta 4S en el experimento M-22.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	11,01	1,58	7,55	0,35	4,14
15	3,93	0,66	6,35	0,63	12,64
30	0,05	0,00	2,45	1,40	20,75
45	0,00	0,00	0,00	1,02	24,78
60	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

5.2.2.2 Interpretación de los resultados experimentales

Tanto en el estudio de un biocatalizador simple (células de 9 h) descrito en el Apartado 5.1 del presente capítulo, como en el empleo de dos biocatalizadores simples en operación secuencial, abordado en el Apartado 5.2.1, se ha visto la influencia que tiene el aumento de biomasa sobre la velocidad del proceso de desulfuración. En el presente apartado, dedicado al estudio de la desulfuración de DBT mediante la combinación simultánea de células de 5 y 23 h de edad, se estudia, igual que en los casos anteriores, como variable la concentración total de biomasa utilizada, incorporándose como variable en este estudio, la proporción de células de cada tiempo de crecimiento que forman parte del biocatalizador. De esta manera, el objetivo de este apartado es conocer la influencia de las dos variables: la concentración total de biomasa y la composición relativa de la mezcla de células de 5 y 23 h. La eficiencia se va a medir como en los apartados anteriores en base a la conversión de DBT a HBP, el tiempo de operación empleado y la menor concentración de biomasa utilizada.

La evaluación de las distintas formulaciones de este biocatalizador compuesto propuestas en la Tabla 5.20, con distintas concentraciones totales de biomasa y proporción de células de 5 y 23 h de edad, se van a evaluar mediante los parámetros ya empleados a lo largo de los apartados anteriores, que se enumeran a continuación.

Se recurre al grado de desulfuración máximo, $X_{BDS}^{máx}$, definido en la ecuación [5.1] para medir la capacidad de conversión que alcanza cada formulación propuesta en un ensayo dado, indicando el tiempo que ha sido necesario en cada caso para alcanzar ese valor máximo, $t_{BDS}^{X_{BDS}^{máx}}$. Para conocer la capacidad de eliminación del sustrato de partida, DBT, se utiliza la velocidad inicial de eliminación de DBT, R_{DBT}^0 , definida en la expresión [3.1] del Capítulo 3 de esta Memoria. Se calcula además, la productividad máxima, $P_{BDS}^{máx}$, alcanzada en cada mezcla de células propuesta, que se describe por la expresión [5.2] y relaciona la máxima conversión alcanzada y el tiempo de operación empleado. La interpretación de los resultados experimentales recogidos en el presente apartado se va a llevar cabo en dos etapas; en la primera de ellas se va a realizar una comparación únicamente entre experimentos realizados empleando una misma concentración total de biomasa; en la segunda etapa, se va a realizar la búsqueda de la

mejor formulación, entre todas las propuestas, de un biocatalizador compuesto formado por células de dos edades celulares en operación simultánea

Comparación entre experimentos con la misma concentración total de biomasa

En la Figura 5.13 se representa la evolución de la concentración de DBT y HBP a lo largo del tiempo de ensayo, para los tres experimentos propuestos con una concentración de biomasa total de 0,7 g peso seco/L.

En el caso de utilizar un biocatalizador formulado únicamente con células de 5 h de tiempo de crecimiento ($Y^{23} = 0$), se obtiene la desaparición de DBT más lenta, entre las tres mezclas probadas para esta concentración de biomasa, como cabría esperar, a causa de la baja actividad en la enzima monooxigenasa DszC que presentan las células de esta edad. Por el contrario, al emplear un biocatalizador compuesto solamente por células de 23 h de edad ($Y^{23} = 1$), se logra una eliminación de DBT más rápida, gracias a la elevada actividad de la enzima DszC que presentan las células a este tiempo. Por otro lado, la evolución del compuesto HBP, al emplear células de una sola edad celular (5 o 23 h) en la formulación del biocatalizador, es bastante parecida. La elevada actividad de la enzima DszB en células de 5 h de edad compensa la menor velocidad de transformación en las primeras etapas, a causa de la actividad más baja en las enzimas monooxigenasas que las catalizan. En el caso opuesto, en el ensayo en que sólo se han utilizado células de 23 h, aunque la elevada actividad de la enzima DszC permite la eliminación rápida de DBT, la producción del compuesto final está limitada a causa de la baja actividad de la enzima desulfinaasa DszB.

La Figura 5.13 muestra que el mejor resultado se obtiene al combinar igual cantidad de células de 5 y 23 h de edad ($Y^{23} = 0,50$), desde el punto de vista de la desaparición del compuesto de partida, DBT, y de su conversión al compuesto libre de azufre, HBP. El empleo simultáneo de ambas edades celulares en un biocatalizador compuesto permite aprovechar la actividad monooxigenasa que ambas edades presentan, y lograr, así, una eliminación de DBT en un tiempo más reducido. La mejora en las primeras etapas de la ruta 4S se observa en los datos experimentales para esta combinación de células en la Tabla 5.22, a la vista de la evolución de los compuestos intermedios DBTO y DBTO₂, que permanecen en el medio durante menos tiempo. Esta ventaja, unida a la mayor actividad desulfinaasa que aportan las células de 5 h, permite alcanzar una mayor concentración de HBP producido en un menor tiempo de operación,

y mejorar la capacidad desulfurante que presentan los biocatalizadores simples formulados a partir de células de un solo tiempo de crecimiento.

En la Tabla 5.43 se muestran los valores obtenidos para los parámetros empleados en la comparación para las combinaciones probadas, con una concentración total de biomasa de 0,7 g peso seco/L. En ninguno de los casos se ha logrado una conversión completa dentro del tiempo de experimentación, siendo mayor el valor del grado de conversión máximo alcanzado, en el caso de una mezcla al 50% de células de edades de 5 y 23 h (en torno al 37%). Asimismo, de acuerdo con lo comentado a raíz de la observación de la Figura 5.13, el mayor valor obtenido en la velocidad inicial de eliminación de DBT, así como la mayor productividad máxima, se obtienen al combinar células de ambas edades celulares.

El biocatalizador compuesto combina las mejores características de cada tipo de células y logra mejorar los resultados logrados por los biocatalizadores simples en que se emplean, por separado, células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento.

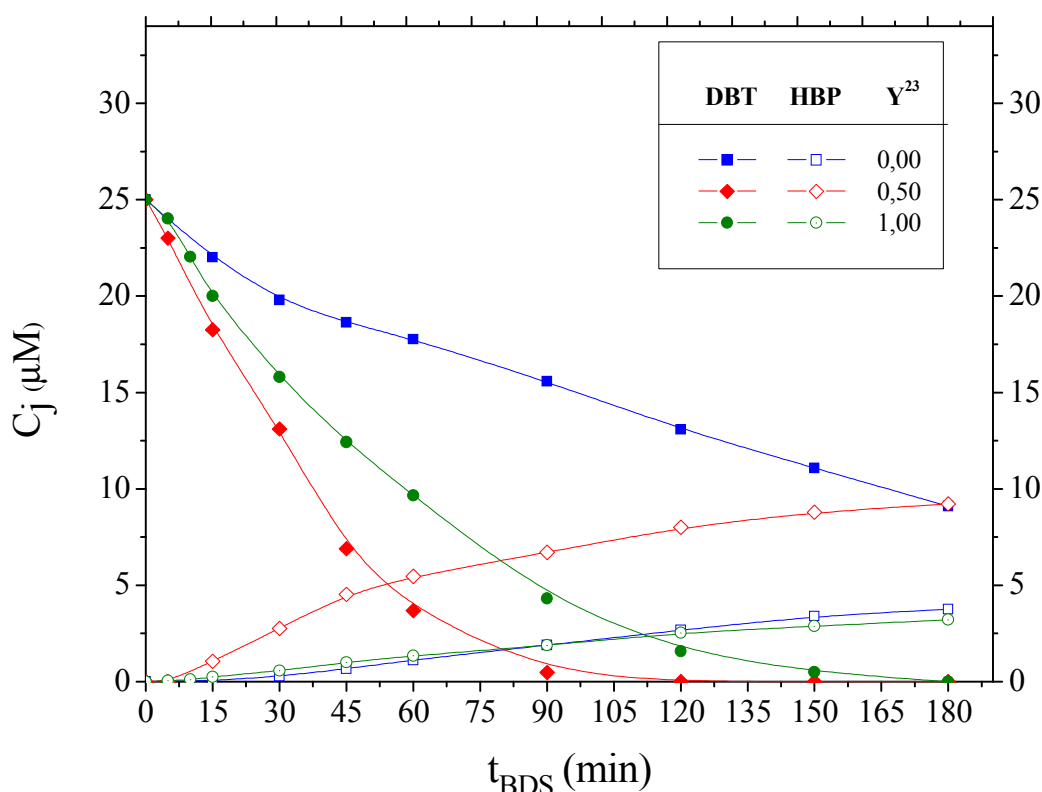


FIGURA 5.13 - Comparación de la evolución de DBT y HBP a la largo del tiempo de desulfuración, empleando mezclas de células de 5 y 23 h en una concentración de biomasa total de 0,7 g peso seco/L.

Tabla 5.43 - Parámetros calculados para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento con una concentración de biomasa total de 0,7 g peso seco/L.

Y^{23}	X_{BDS}^{max}	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$	R_{DBT}^0	P_{BDS}^{max}
	(%)	(min)	($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).	(%/min)
0,00	15,04	180	0,129	0,084
0,50	36,88	180	0,605	0,205
1,00	12,84	180	0,475	0,071

De manera análoga al caso anterior, se muestra en la Figura 5.14 la evolución de la concentración de DBT y HBP a lo largo de los experimentos en que se ha empleado una concentración total de biomasa de 1,4 g peso seco/L.

La evolución de la concentración de DBT al emplear un biocatalizador formado únicamente por células de 5 h ($Y^{23} = 0$) es la más lenta de las tres combinaciones probadas, como se observa en la citada figura. Esto se debe, como se ha comentado, a la moderada actividad de la enzima DszC a este tiempo de crecimiento. La baja producción de HBP, en comparación con los otros dos casos, se justifica por la escasa actividad de la enzima DszA que limita la velocidad de la tercera reacción implicada en la ruta 4S, a pesar de presentar esta edad celular la mayor actividad de la enzima DszB.

En la Figura 5.14 se observa, además, el buen resultado que se obtiene al emplear un biocatalizador formado exclusivamente por células de 23 h de edad ($Y^{23} = 1$). Estas células aventajan a las de 5 h de edad para llevar a cabo la ruta 4S con la misma concentración de biomasa. Al comparar esta situación con la que se obtiene en el caso reflejado en la Figura 5.13, se aprecia que duplicar la concentración de biomasa permite mejorar notablemente la eliminación del compuesto de partida. La pequeña actividad desulfinasas que presentan las células de 23 h se compensa, al emplear mayor concentración celular, con la elevada actividad de las enzimas monooxigenasas DszC y DszA, para llevar a cabo las tres primeras etapas de la ruta 4S y lograr una buena transformación en HBP, a la vista de los datos obtenidos y recopilados en la Tabla 5.26. Resulta ser, por estos motivos, la mejor combinación entre las formulaciones propuestas para esta concentración de biomasa total.

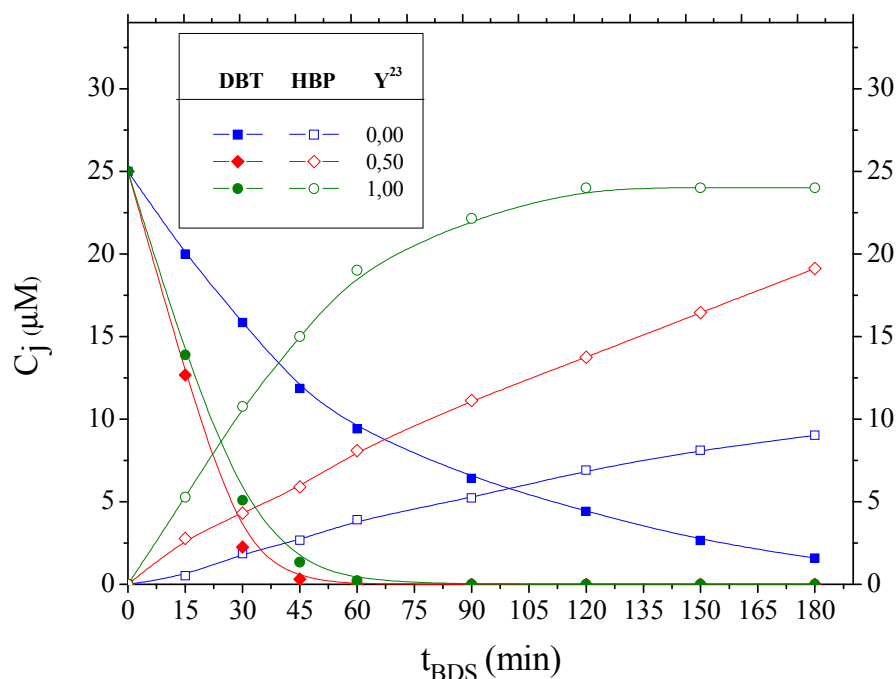


FIGURA 5.14 - Comparación de la evolución de DBT y HBP a la largo del tiempo de desulfuración, empleando mezclas de células de 5 y 23 h en una concentración de biomasa total de 1,4 g peso seco/L.

Con el biocatalizador compuesto formado por la mezclar células de 5 y 23 h de edad ($Y^{23} = 0,50$), se logra la mejor eliminación de DBT de los tres casos presentados en la Figura 5.14. Esto se debe a que los dos tipos de células aportan una actividad de la monooxigenasa DszC muy adecuada para eliminar DBT de manera eficaz. Sin embargo, la deficiencia de las células de 5 h, a causa de su baja actividad de la monooxigenasa DszA, limita la consecución de la tercera reacción, y a pesar de lograr una conversión bastante elevada (76%), el biocatalizador compuesto no logra mejorar los resultados obtenidos con células de 23 h de tiempo de crecimiento.

A la vista de los valores obtenidos para los parámetros que se muestran en la Tabla 5.44, y de acuerdo con lo comentado previamente, la mezcla de células de 5 y 23 h de edad permite la mejor desaparición de DBT con una velocidad inicial de eliminación de 1,639 $\mu\text{mol/L/min}$. Sin embargo, gracias a las características del biocatalizador simple, formado solamente con células de 23 h de tiempo de crecimiento, esta formulación del biocatalizador permite alcanzar el valor más alto en el grado de desulfuración máximo y en la productividad máxima (96% y 0,533 %/min, respectivamente) en comparación con las otras dos combinaciones probadas para una concentración total de biomasa de 1,4 g peso seco/L.

TABLA 5.44 - Parámetros calculados para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento con una concentración de biomasa total de 1,4 g peso seco/L.

Y^{23}	$X_{BDS}^{máx}$	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{máx}}$	R_{DBT}^0	$P_{BDS}^{máx}$
	(%)	(min)	($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).	(%/min)
0,00	36,08	180	0,398	0,200
0,50	76,44	180	1,638	0,425
1,00	96,00	180	1,206	0,533

En el caso de emplear una concentración de biomasa total de 2,1 g peso seco /L se obtienen las evoluciones de DBT y HBP que se muestran en la Figura 5.15.

El empleo de células de 5 h únicamente en la formulación del biocatalizador ($Y^{23} = 0$) da lugar una conversión bastante aceptable de DBT en HBP (alrededor del 82%). Sin embargo, a causa de la menor actividad de las enzimas DszA y DszC, genera los peores resultados entre las cuatro formulaciones estudiadas para esta concentración total de biomasa. Lógicamente, a medida que se emplea una proporción mayor de células de 23 h de tiempo de crecimiento, la desaparición de DBT tiende a ser más rápida. Al utilizar células de 23 h de edad sin combinar con las de 5 h de tiempo de crecimiento en la formulación del biocatalizador ($Y^{23} = 1$), se consigue acelerar considerablemente la desaparición del compuesto de partida, DBT, con respecto al caso comentado previamente. Al principio del ensayo, la producción del compuesto final, HBP, es muy rápida; aunque se ralentiza a mayores tiempos de ensayo, en comparación con las otras combinaciones que se presentan en la Figura 5.15.

Aunque dentro de este grupo de experimentos, con 2,1 g peso seco/L de concentración celular total, las células de 23 h presentan unas capacidades muy adecuadas para la eliminación de DBT, la eficacia del biocatalizador mejora al combinar células de 5 y 23 h de edad. De esta manera, la presencia de células de 5 h en la formulación del biocatalizador aumenta la actividad desulfinasas (que poseen las células más jóvenes), de forma que las mezclas probadas que combinan células de ambos tiempos de crecimiento ($Y^{23} = 0,33$ y $0,67$) logran alcanzar la conversión completa reduciendo el tiempo de operación necesitado si se opera con el caso de utilizar exclusivamente células de 23 h de edad (180 min).

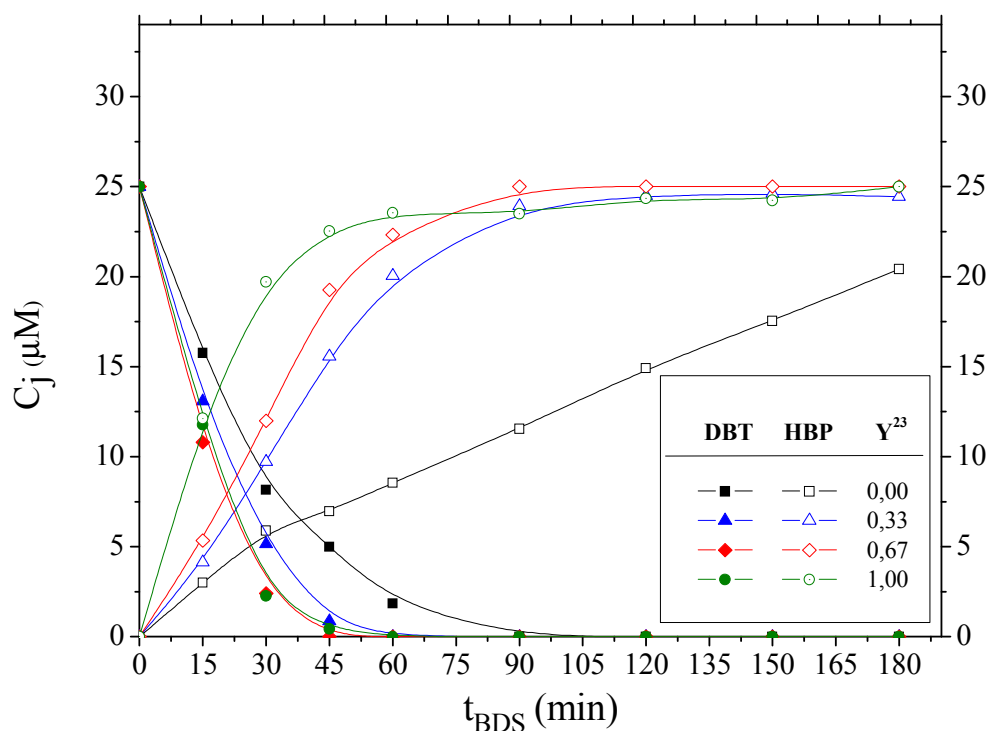


FIGURA 5.15 - Comparación de la evolución de DBT y HBP a la largo del tiempo de desulfuración, empleando mezclas de células de 5 y 23 h en una concentración de biomasa total de 2,1 g peso seco/L.

En la Tabla 5.45 se recopilan los valores de los parámetros empleados para realizar esta comparación. En todos los casos, el grado de desulfuración alcanzado es mayor del 80%. Si bien, sólo en el caso de combinar células de las dos edades celulares se logra llegar a conversión completa antes de los 120 min. La velocidad inicial de eliminación de DBT que consiguen las células de 23 h sin combinar ($Y^{23} = 1$) es muy elevada ($1,638 \mu\text{mol/L/min}$), pero este valor es superado al emplear una mezcla con $Y^{23} = 0,67$ ($1,714 \mu\text{mol/L/min}$). Es esta formulación del biocatalizador compuesto la que logra la productividad máxima más alta de las cuatro combinaciones probadas con 2,1 g peso seco/L de concentración de biomasa total ($1,111 \text{ \%/min}$), seguida por la otra combinación de menor proporción de células de 23 h de edad ($0,814 \text{ \%/min}$).

TABLA 5.45 - Parámetros calculados para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento con una concentración de biomasa total de 2,1 g peso seco/L.

Y^{23}	$X_{BDS}^{máx}$	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{máx}}$	R_{DBT}^0	$P_{BDS}^{máx}$
	(%)	(min)	($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).	(%/min)
0,00	81,68	180	0,886	0,454
0,33	97,72	120	1,339	0,814
0,67	100,00	90	1,714	1,111
1,00	100,00	180	1,638	0,556

En este grupo de experimentos el mejor resultado se obtiene al combinar células de 5 y 23 h, con un 67% de células de la mayor edad; tanto desde el punto de vista de la eliminación del sustrato de partida, como si se tiene en cuenta la máxima conversión alcanzada en el menor tiempo.

En la Figura 5.16 se muestra la evolución de la concentración de DBT y HBP al emplear las diferentes formulaciones propuestas para el biocatalizador compuesto con una concentración de biomasa total de 2,8 g peso seco/L. Mediante el empleo de estas combinaciones de células se ha alcanzado la conversión total de DBT en HBP en todos los casos.

En particular, el empleo de un biocatalizador formado únicamente por células de 5 h ($Y^{23} = 0$) da lugar a la desaparición de DBT más lenta dentro de este grupo de experimentos, y a la acumulación más prolongada en el tiempo de los intermedios de la ruta 4S (como se observa en la Tabla 5.31), a causa de su ya conocida menor actividad en las enzimas monooxigenasas DszC y DszA. Esta situación, a pesar de la elevada actividad desulfinasas que presentan las células de este tiempo de crecimiento, no logra mejores resultados que las otras combinaciones probadas, como se observa en la citada figura.

Se observa además en la Figura 5.16, que la aparición de HBP es más rápida a tiempos bajos, al emplear células de 23 h sin combinar ($Y^{23} = 1$), mientras que a tiempos largos de experimentación, los biocatalizadores compuestos por células de dos edades, alcanzan mayores velocidades de producción de este compuesto, como sucede en los casos estudiados previamente.

Así, en este grupo de experimentos realizados con una biomasa total de 2,8 g peso seco/L, el empleo de combinaciones de células de 5 y 23 h de edad en proporciones importantes de células de la mayor edad ($Y^{23} = 0,50$ y $0,75$), mejoran la eliminación de DBT y la producción de HBP que se consigue al utilizar un biocatalizador formulado solamente con células de 23 h de tiempo de crecimiento. En particular, la combinación de células de 5 y 23 h con un 75% de células de 23 h logra la conversión más rápida entre las cinco mezclas propuestas. Esto se justifica por el hecho de que, aunque las células de 23 h tienen una actividad muy elevada en las enzimas DszC y DszA para llevar a cabo las tres primeras reacciones de la ruta 4S, la participación de células de 5 h, por su alta actividad desulfinasas, que cataliza la reacción final de la ruta 4S, permite claramente acelerar el proceso y hacerlo más eficaz.

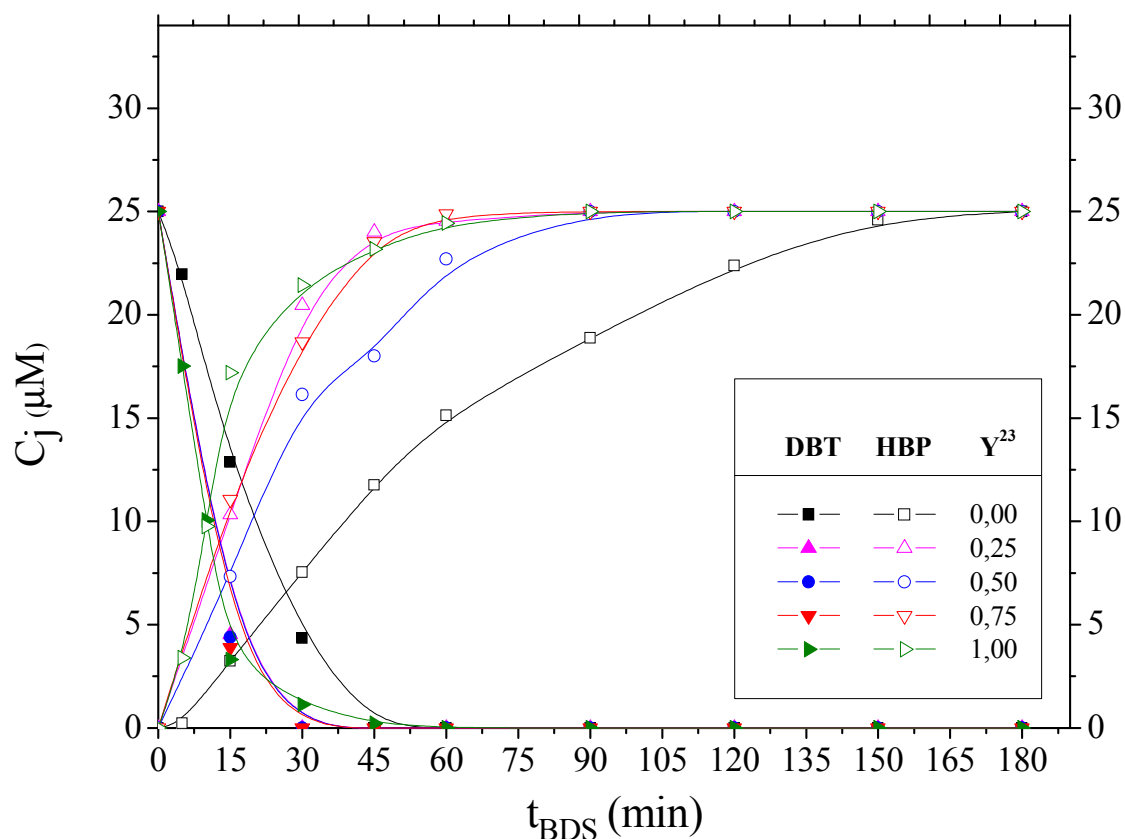


FIGURA 5.16 - Comparación de la evolución de DBT y HBP a la largo del tiempo de desulfuración, empleando mezclas de células de 5 y 23 h en una concentración de biomasa total de 2,8 g peso seco/L.

En la Tabla 5.46 se muestran los valores de los parámetros empleados para este estudio, obtenidos para las cinco combinaciones estudiadas. Todas las formulaciones propuestas para el biocatalizador en que existe participación de células de 23 h de edad consiguen la reducción del tiempo de operación, alcanzando la conversión del 100% en 90 min o menos. Las mayores velocidades iniciales de eliminación de DBT se logran en las combinaciones de células de dos edades, alcanzando valores en torno a 3 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. En todos estos casos, el valor de productividad máxima alcanzado es, por tanto, elevado (1,111 $\%/min$). Es posible que en el caso de haber muestreado entre 60 y 75 min se hubieran observado diferencias, seguramente, por la evolución de los datos, más favorable hacia las mezclas de células de dos edades.

Dentro de este grupo de experimentos, la combinación que da lugar a mejores resultados de eliminación y producción es la que presenta un valor de $Y^{23} = 0,75$.

TABLA 5.46 - Parámetros calculados para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento con una concentración de biomasa total de 2,8 g peso seco/L.

Y^{23}	$X_{BDS}^{m\acute{a}x}$	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{m\acute{a}x}}$	R_{DBT}^0	$P_{BDS}^{m\acute{a}x}$
	(%)	(min)	($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).	($\%/min$)
0,00	100,00	120	1,258	0,833
0,25	100,00	90	2,924	1,111
0,50	100,00	90	2,973	1,111
0,75	100,00	90	3,159	1,111
1,00	100,00	90	2,431	1,111

La evolución de los compuestos DBT y HBP para cuatro biocatalizadores probados en concentraciones totales de biomasa de 3,5 g peso seco/L se muestra en la Figura 5.17.

De manera análoga a los casos comentados previamente, el empleo de células de 5 h sin combinar con células de 23 h, da lugar a la peor eliminación del compuesto de partida y a la producción de HBP más lenta, entre las combinaciones propuestas con esta concentración total de biomasa. Asimismo, el empleo aislado de células de 23 h de tiempo de crecimiento demuestra que estas células constituyen un biocatalizador eficaz, desde el punto de vista de la eliminación de DBT y la producción de HBP. Sin embargo, la combinación de células de estas dos edades celulares permite una mejora notable con respecto al empleo de biocatalizadores simples de concentraciones de biomasa equivalentes. En este caso, las combinaciones con un 40 y un 60 % de células de 23 h de edad son las que logran la desaparición más rápida del compuesto de partida, DBT, y la producción más eficaz de HBP.

En la Tabla 5.47 se recogen los resultados de este estudio comparativo mediante los parámetros ya comentados. La conversión total de DBT en HBP se logra a los 120 min en el caso de emplear células de 5 h sin combinar ($Y^{23} = 0$), y sólo en 90 min al utilizar sólo células de 23 h de tiempo de crecimiento ($Y^{23} = 1$). Las combinaciones de células de 5 y 23 h logran reducir el tiempo para alcanzar la conversión del 100% a 60 min. También son las mezclas de células de diferente edad las que consiguen las mayores velocidades iniciales de eliminación de DBT, produciendo mayores valores en la velocidad inicial de eliminación de DBT, R_{DBT}^0 . Destaca el caso del biocatalizador con un 60% de células de 23 h, que proporciona una velocidad inicial de 4,102 $\mu\text{mol/L/min}$. La productividad máxima en los casos en que se ha combinado células de 5 y 23 h es de 1,667 %/min.

La mejor opción, dentro de este grupo de experimentos, parece ser la combinación de 1,4 g peso seco/L de células de 5 h de tiempo de crecimiento y 2,1 g peso seco /L de células de 23 h de tiempo de crecimiento ($Y^{23} = 0,40$), por su mayor velocidad de eliminación de DBT y la mayor velocidad de producción de HBP.

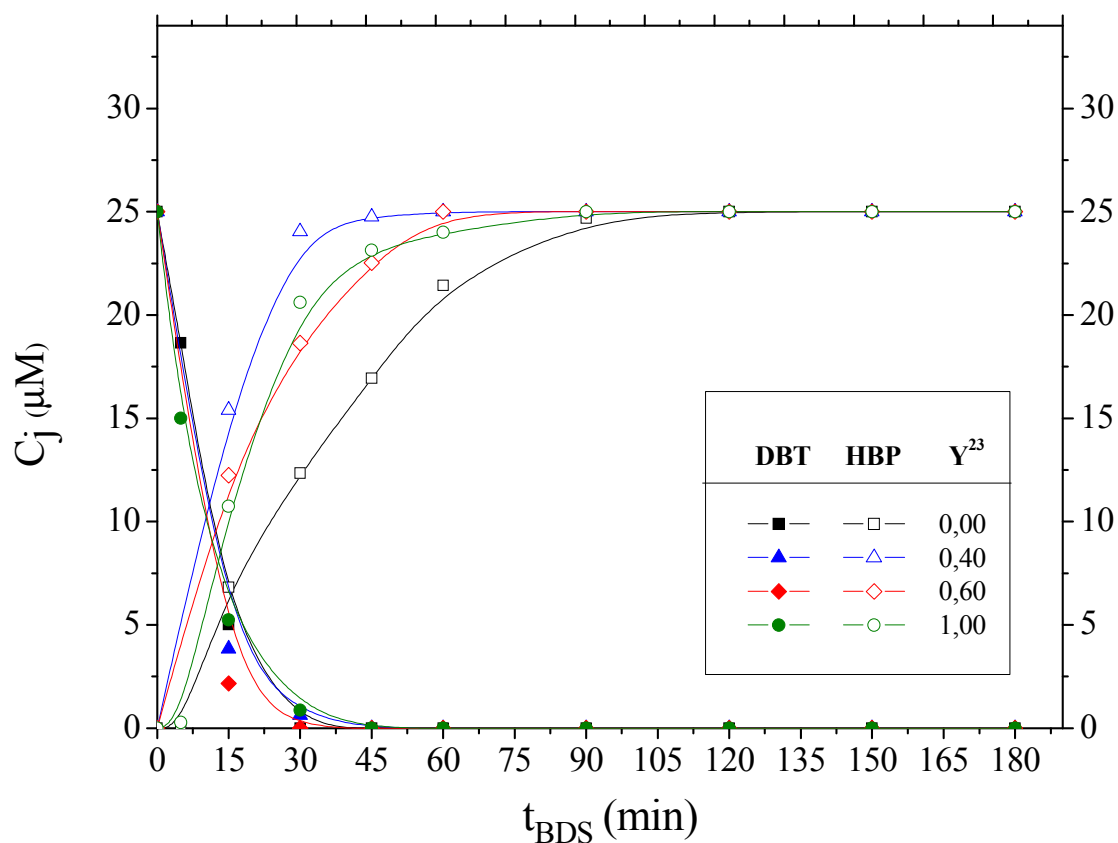


FIGURA 5.17 - Comparación de la evolución de DBT y HBP a la largo del tiempo de desulfuración, empleando mezclas de células de 5 y 23 h en una concentración de biomasa total de 3,5 g peso seco/L.

TABLA 5.47 - Parámetros calculados para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento con una concentración de biomasa total de 3,5 g peso seco/L.

Y^{23}	$X_{\text{BDS}}^{\text{máx}}$	$t_{\text{BDS}}^{X_{\text{BDS}}^{\text{máx}}}$	R_{DBT}^0	$P_{\text{BDS}}^{\text{máx}}$
	(%)	(min)	($\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$).	(%/min)
0,00	100,00	120	2,242	0,833
0,40	100,00	60	3,118	1,667
0,60	100,00	60	4,102	1,667
1,00	100,00	90	2,598	1,111

Finalmente, se analizan tres experimentos en los que la concentración celular total empleada es de 4,2 g peso seco/L. La evolución de las concentraciones de DBT y de HBP se presenta en la Figura 5.18 a lo largo del tiempo.

En los tres casos citados, el empleo de los biocatalizadores de esta concentración de células es muy bueno, desde el punto de vista de la eliminación del compuesto de partida y de la conversión alcanzada en un tiempo bastante reducido. En todos los casos, se consigue la transformación total de DBT en HBP en menos de 90 min de reacción.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la mayoría de los casos anteriores, el ensayo de desulfuración llevado a cabo con el empleo del biocatalizador formulado exclusivamente con células de 5 h ($Y^{23} = 0$), es el que da lugar a la producción del compuesto final más lenta entre las tres formulaciones propuestas. La utilización de células de 23 h sin combinar ($Y^{23} = 1$) elimina el compuesto DBT a una velocidad similar, aunque con una velocidad de producción de HBP sensiblemente mayor a la que se logra al emplear sólo células de 5 h de edad, según se observa en la Figura 5.18.

El biocatalizador compuesto formado por células de 5 y 23 h a partes iguales, $Y^{23} = 0,50$, permite la mejor desulfuración de DBT, desde el punto de vista de la eliminación de DBT más rápida y de la menor acumulación de compuestos intermedios de la ruta 4S (a la vista de los resultados de la Tabla 5.41). Sobre todo, resulta ser la combinación de células que da lugar a la mejor y más rápida transformación de DBT en HBP, entre las tres posibilidades consideradas en este grupo de experimentos.

A la vista de los valores de los parámetros recogidos en la Tabla 5.48, la mayor velocidad de eliminación se presenta al emplear un biocatalizador compuesto por la mezcla de células de ambas edades al 50%, con un valor de 4,352 $\mu\text{mol/L/min}$. El tiempo necesario para el máximo grado de desulfuración se reduce hasta 60 min, obteniéndose un valor de productividad máxima de 1,667 $\%/min$.

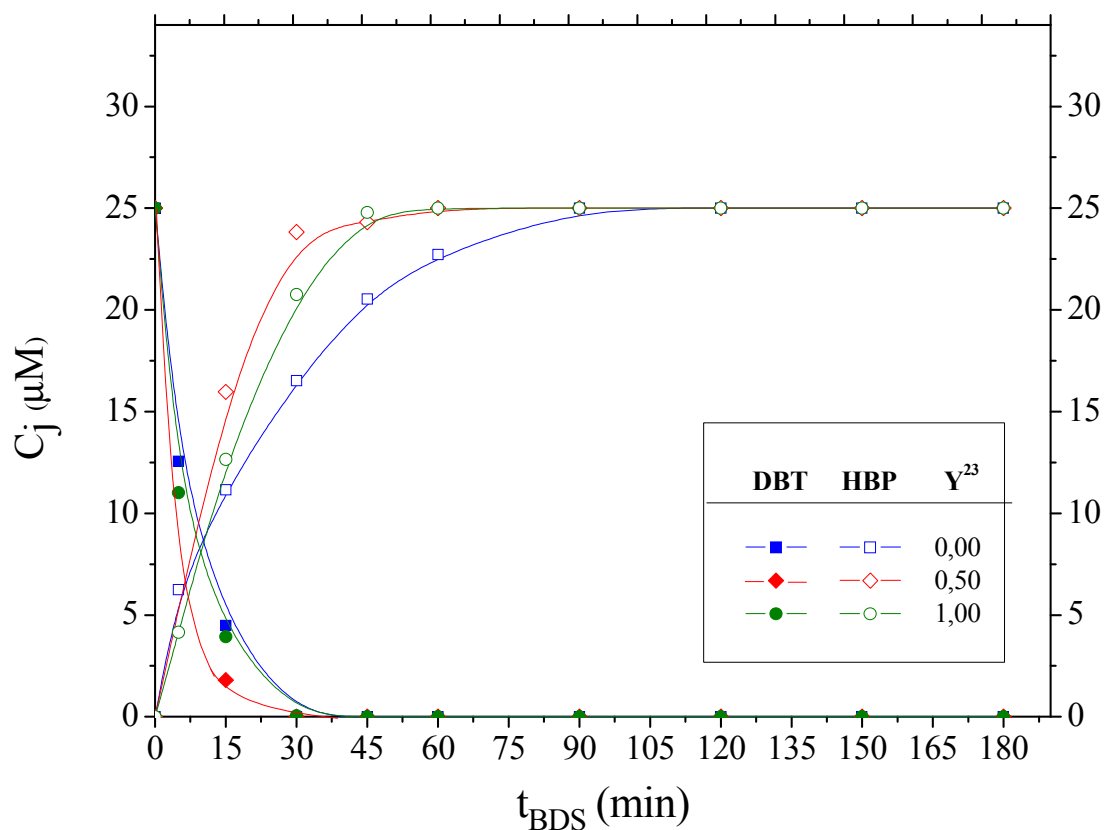


FIGURA 5.18 - Comparación de la evolución de DBT y HBP a la largo del tiempo de desulfuración, empleando mezclas de células de 5 y 23 h en una concentración de biomasa total de 4,2 g peso seco/L.

TABLA 5.48 - Parámetros calculados para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento con una concentración de biomasa total de 4,2 g peso seco/L.

Y^{23}	X_{BDS}^{max}	$t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$	R_{DBT}^0	P_{BDS}^{max}
	(%)	(min)	($\mu mol/L \cdot min$).	(%/min)
0,00	100	90	3,220	1,111
0,50	100	60	4,351	1,667
1,00	100	60	3,770	1,667

A continuación, tras este estudio de los resultados obtenidos para cada grupo de experimentos a una concentración de biomasa total fijada, se va a proceder a evaluar, de forma global, la bondad de las 22 formulaciones probadas para el biocatalizador compuesto. En primer lugar, se considera la capacidad que presenta cada formulación para transformar el compuesto de partida, DBT, en HBP, a través de la ruta 4S. Con este fin, se ha estudiado el grado de desulfuración máximo, X_{BDS}^{max} que se alcanza en cada uno de los ensayos. En la Figura 5.19 se representa el valor que se ha obtenido de este parámetro para las formulaciones de este biocatalizador, representadas cada una por un valor de concentración de biomasa total, C_X^T , y un valor de la fracción másica de células de 23 h, Y^{23} . Como se observa en la citada figura, indudablemente, el aumento en la concentración de biomasa total empleada logra mayores conversiones.

Por otro lado, interesa conocer qué efecto tiene emplear distintas proporciones de células de 5 y 23 h de edad sobre el parámetro X_{BDS}^{max} . En la Figura 5.21 se observan conversiones máximas crecientes a medida que aumenta la fracción másica de células de 23 h, Y^{23} para cada una de las concentraciones totales de biomasa empleadas, salvo para el caso de la menor concentración total de biomasa probada (0,7 g peso seco/L). Se refleja así, la importancia de las células de 23 h de tiempo de crecimiento en la conversión de DBT en HBP, por facilitar las tres primeras reacciones de la ruta 4S, como se ha comentado anteriormente a lo largo del presente capítulo.

En el caso particular de emplear bajas concentraciones de biomasa (0,7 g peso seco/L), el efecto que tiene la reducida actividad desulfinasas de las células de mayor edad (23 h) es mínimo. De hecho, la conversión máxima alcanzada es mayor cuando se combinan las células de 23 h de edad con células de 5 h en el biocatalizador, a diferencia del comportamiento general que se ha comentado previamente. Al emplear concentraciones totales de biomasa de 1,4 y 2,1 g peso seco/L y valores de $Y^{23} = 1$, es decir, en ausencia de células de 5 h, se alcanzan mayores grados máximos de desulfuración. Esto se debe a que, al utilizar una concentración total de biomasa más alta, la transformación que tiene lugar en las tres primeras etapas de la ruta 4S es más intensa. Aunque la capacidad desulfinasas de las células de mayor edad sea reducida, favorecer las primeras etapas de la ruta 4S permite llevar a cabo la transformación de DBT en HBP en un mayor grado y conseguir así una producción de HBP mayor.

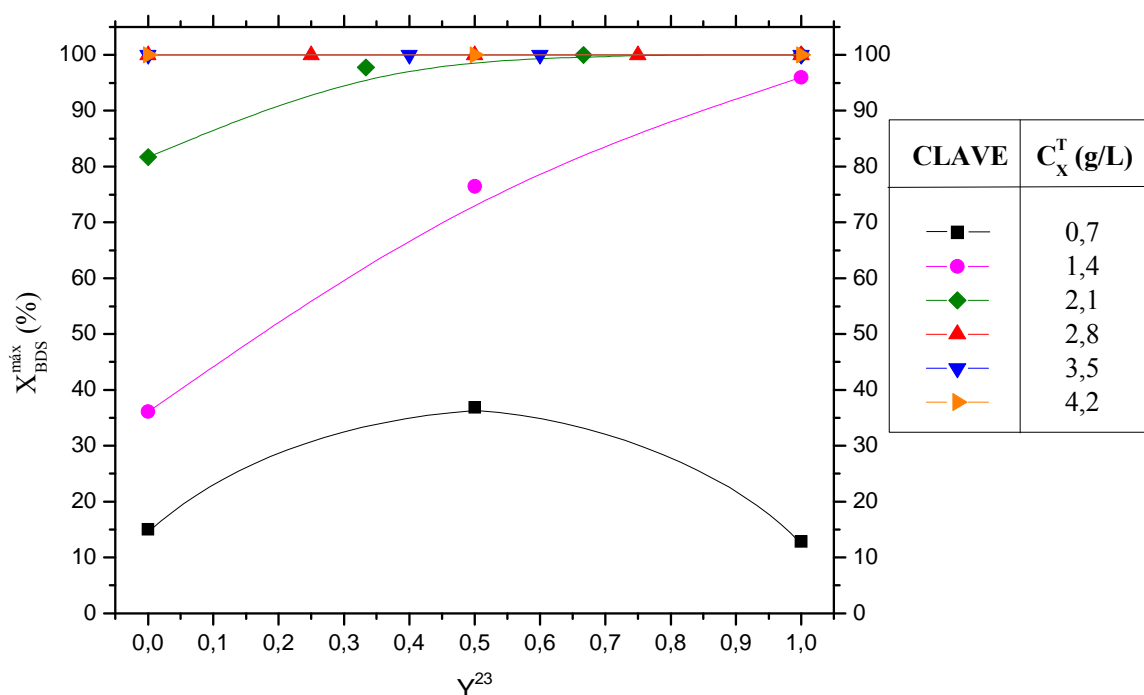


FIGURA 5.19 – Grado de desulfuración máximo para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento.

Como se observa en la Figura 5.19, al emplear concentraciones totales de biomasa superiores a 2,1 g peso seco/L, se logra alcanzar la conversión total de DBT en HBP en todos los casos. Es necesario referirse al tiempo de ensayo empleado, $t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$, y a los valores de productividad máxima, P_{BDS}^{max} , para comparar la bondad de cada formulación propuesta, como se ha hecho en las Tablas 5.46, 5.47 y 5.48 para concentraciones totales de biomasa de 2,8, 3,5 y 4,2 g peso seco/l, respectivamente.

En la Figura 5.20 se representa la velocidad inicial de eliminación de DBT, R_{DBT}^0 , para los diferentes biocatalizadores estudiados en función de la concentración celular total y la composición del biocatalizador en células de 5 y 23 horas de edad.

De igual manera que en el caso del grado de desulfuración máximo, se muestra, en la Figura 5.20 el aumento progresivo de las velocidades iniciales de eliminación de DBT al utilizar mayores concentraciones de biomasa total. Para cada una de las concentraciones totales ensayadas, se observa una tendencia común al aumentar la fracción másica de células de 23 h. en todos los casos: la velocidad inicial de desaparición de DBT es mayor en las mezclas de células que en los casos en que se han

empleado bien sólo células de 5 h, o bien células de 23 h de edad sin combinar. También se observa que, para cada grupo de experimentos de igual concentración celular total, se presentan máximos en este parámetro para valores del 50% o mayores de células de 23 h de edad en las mezclas celulares.

A partir de los resultados obtenidos hasta ahora, se puede decir que la participación de las células de 23 h es muy importante a la hora de determinar la velocidad de desaparición del compuesto de partida, DBT, y los compuestos intermedios DBTO y DBTO₂, gracias a su alta actividad en las enzimas monooxigenasas DszA y DszC. La eliminación de los compuestos implicados en las primeras etapas de la ruta 4S determina el grado de desulfuración alcanzado.

Sin embargo, es indudable que la participación de una cantidad de células de 5 h, aunque no sea mayoritaria en la formulación de la mezcla, es importante, además, para mejorar la eficacia del biocatalizador compuesto. La presencia de células de 5 h, gracias a su alta actividad en la enzima desulfinasas DszB, permite mejorar los resultados obtenidos cuando solamente se emplearon células de 23 h, ya que se obtiene HBP, el único compuesto libre de azufre.

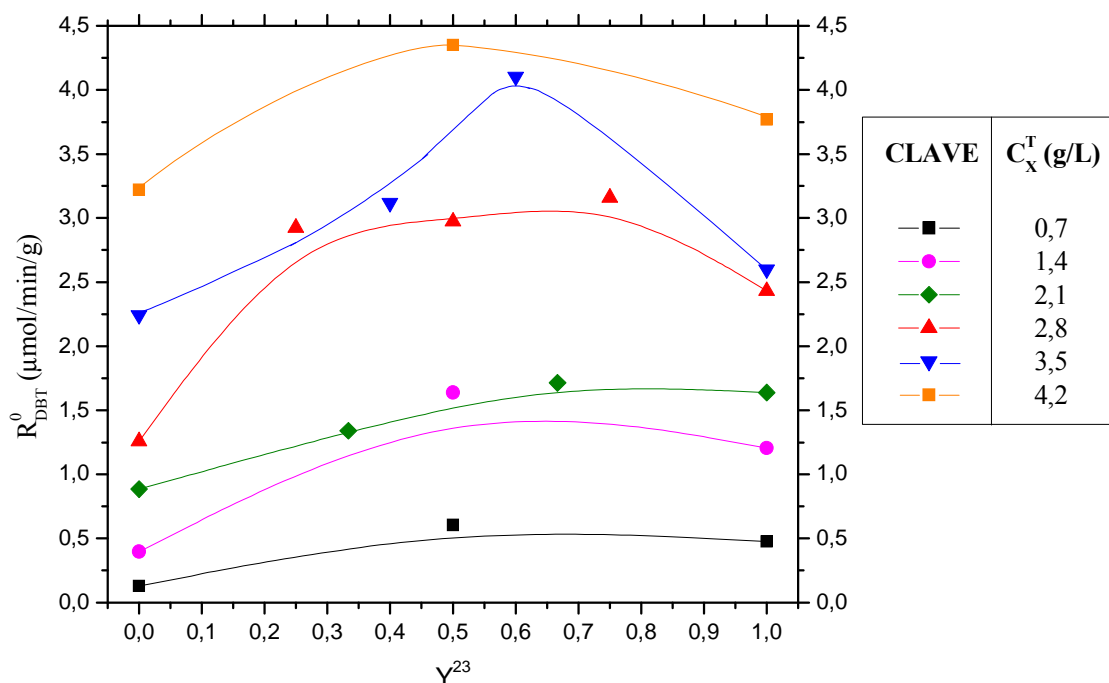


FIGURA 5.20 - Velocidad inicial de eliminación de DBT para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento.

La siguiente tarea que se aborda es encontrar la mejor formulación, al menos entre las ensayadas, para este biocatalizador compuesto, que dé lugar a la eliminación más rápida del compuesto de partida, la mayor conversión de DBT en HBP, en el menor tiempo, y con el menor gasto de biomasa. A la hora de establecer un criterio para discriminar entre las diferentes combinaciones propuestas en la Tabla 5.20, se ha optado por el **grado de desulfuración específico, E** , parámetro que se define como:

$$E = \frac{X_{BDS}^{max}}{t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}} \cdot C_X^{5+23}} \quad [5.7]$$

En la búsqueda de la mejor composición del biocatalizador, se ha procedido a maximizar el valor obtenido de este parámetro E , considerando las variables concentración total de biomasa, C_X^T y fracción másica de células de 23 h de edad, Y^{23} .

En la Figura 5.21 se representa el grado específico de desulfuración, E , para las diferentes formulaciones ensayadas. Se observa que al comparar los resultados obtenidos para biocatalizadores formulados sólo con células de 5 h de edad ($Y^{23} = 0$) y los formados sólo por células de 23 h de tiempo de crecimiento ($Y^{23} = 1$), con concentraciones equivalentes de biomasa total, el parámetro E es mayor en el segundo caso en todas las situaciones, salvo cuando se emplea una concentración total de biomasa de 0,7 g peso seco/L, como se ha comentado previamente. De forma coherente con las diferentes interpretaciones y conclusiones obtenidas de las etapas anteriores de este estudio, el empleo de biocatalizadores con participación exclusiva de células de 5 h ($Y^{23} = 0$) no da lugar a los mayores valores de E , que llegan en alguno de los casos hasta 0,3 %·L/g/min. Por otro lado, las células de 23 h, utilizadas sin combinar ($Y^{23} = 1$), presentan buenas capacidades para desulfurar DBT. El aumento de biomasa permite alcanzar valores en el grado específico de desulfuración en alguno de los casos, de hasta 0,4 %·L/g/min.

Para cada una de las concentraciones totales de biomasa consideradas, existen máximos en el valor del parámetro E que dependen del valor que toma la variable Y^{23} . De esta manera, se puede observar que las combinaciones de células de 5 y 23 h permiten situaciones de mayor eficacia; dando lugar a valores mayores que los obtenidos al emplear células de 5 y 23 h sin combinar, para cada una de las concentraciones totales de biomasa evaluadas. Estos valores se han obtenido en

combinaciones simultáneas de células de 5 y 23 h y se encuentran entre 0,25 y 0,53 %·L/g/min.

Finalmente, de todos los resultados que se presentan en la Figura 5.21, destaca una combinación; al emplear una concentración de biomasa total de 2,1 g peso seco/L y una fracción másica de células de 23 h de 0,67, se consigue un valor del E de 0,529 %·L/g/min. Esta formulación del biocatalizador logra el mejor aprovechamiento de la biomasa empleada de todas las combinaciones propuestas, y consigue la mayor conversión por unidad de tiempo y concentración de células utilizada, entre los 22 casos estudiados.

El empleo de mayores concentraciones totales de biomasa no parece la solución desde el punto de vista del aprovechamiento de las células para desulfurar DBT en condiciones de *resting cells*, si se piensa en una operación industrial, seguramente en continuo (o semicontinuo) donde el ahorro de biomasa se traduciría en ahorro de volumen de equipo.

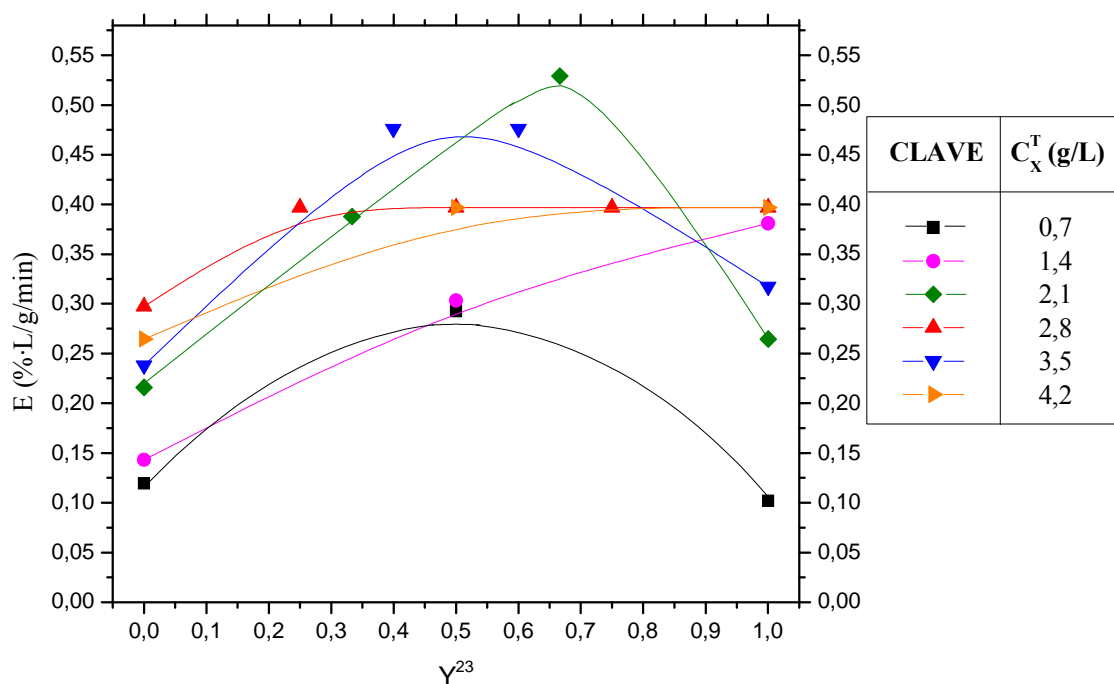


FIGURA 5.21 - Grado de desulfuración específico para diferentes combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento.

La participación de células de ambos tiempos de crecimiento, 5 y 23 h, en la composición de este biocatalizador da mejores resultados. Dentro de las posibilidades propuestas, se ha demostrado la importancia de la combinación de células de diferente edad en formulación de un biocatalizador, mejorando las características del biocatalizador simple formado por células de 9 h de *Pseudomonas putida* CECT5279. Mediante la combinación simultánea de células que presentan la máxima actividad en las enzimas monooxigenasas de la ruta 4S y de células que poseen la mayor actividad en la enzima desulfinasas DszB de la misma ruta, se logra mejorar la operación de desulfuración llevada a cabo mediante el empleo de este biocatalizador simple.

5.3 Comparación de las diferentes formas de operación

A lo largo de los apartados de este capítulo se han ido realizando diferentes estudios sobre formas de operación para desulfurar DBT en fase acuosa en condiciones de *resting cells*, partiendo de la información que se obtuvo en el Capítulo 4 respecto a la medida de las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S a lo largo del tiempo de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279.

En primer lugar, se realizaron experimentos de desulfuración de DBT durante el crecimiento del microorganismo, de lo que se dio cuenta en el Capítulo 3 de esta Memoria.

En segundo lugar, se estudió la operación en *resting cells*. Se han empleado células de 9 h de tiempo de crecimiento de este microorganismo en diferentes concentraciones de biomasa viendo el efecto del aumento de la concentración celular en la velocidad inicial de eliminación de DBT, el grado de desulfuración máximo alcanzado y el tiempo necesario para esa conversión. Se ha escogido esta edad para realizar ensayos con este biocatalizador simple, por presentar la máxima capacidad desulfurante cuando se emplean de esta forma, y se utilizado como biocatalizador simple y referencia para estudiar otras formas de operación.

El estudio ya mencionado en el que se realizó la medida de las actividades intracelulares de las enzimas de la ruta 4S permitió conocer que las células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de 5 h de tiempo de crecimiento presentan la mayor actividad de la enzima desulfinasas, que cataliza la última etapa de la ruta 4S. Asimismo, se determinó que las células de este microorganismo de 23 h de edad poseen la mayor

actividad de las enzimas monooxigenasas DszC y DszA, que controlan las tres primeras reacciones de la ruta 4S. A raíz de esta situación, se propusieron dos nuevas formas de operación mediante el empleo de biocatalizadores compuestos, es decir, formados por dos edades celulares, 5y 23 h. La primera de éstas formas consiste en la desulfuración de DBT en dos etapas secuenciales, empleando en la primera etapa un biocatalizador simple de 23 h, para llevar a cabo fundamentalmente las primeras tres reacciones de la ruta 4S, y en la segunda etapa, un biocatalizador simple de 5 h, para llevar a cabo principalmente la última reacción de la ruta. La segunda de estas dos nuevas formas de operar consiste en el empleo simultáneo de biocatalizadores simples de ambas edades celulares.

En la Figura 5.22 se comparan los resultados obtenidos al emplear la formulación optimizada del biocatalizador compuesto con los que se consiguen al desulfurar durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 (siempre con una concentración inicial de DBT equivalente de 25 μ M). A causa del tiempo de operación tan prolongado, de 8 h, la eficacia del proceso durante el crecimiento es bastante baja en comparación con los valores de productividad máxima y del grado de desulfuración que se obtienen al emplear el biocatalizador complejo en condiciones de *resting cells*. Se ha utilizado el experimento de desulfuración durante el crecimiento realizado con una concentración inicial de DBT de 25 μ M a fin de poder comparar con los experimentos que se están comentando en este apartado, realizados a esa misma concentración. A la vista de los resultados que se comentan en el Apartado 3.3 de la presente Memoria, el aumento de concentración inicial de DBT lleva a peores resultados al desulfurar durante el crecimiento, partiendo de la misma concentración de biomasa.

La desulfuración durante el crecimiento del microorganismo no parece dar buenos resultados, comparados con los que se ha obtenido al trabajar en condiciones de *resting cells*, combinando células de máxima actividad monooxigenasa (de 23 h de edad) y células de máxima actividad desulfinasas (de 5 h de edad)

5. FORMAS DE OPERACIÓN PARA LA DESULFURACIÓN DE DBT

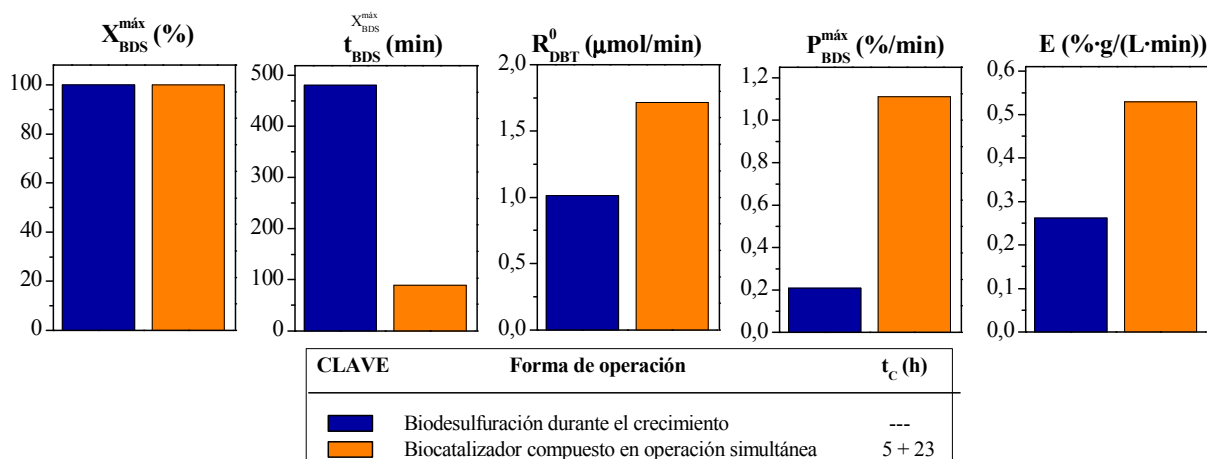


FIGURA 5.22 - Comparación entre el empleo de la formulación óptima del biocatalizador compuesto y la desulfuración durante el crecimiento con *Pseudomonas putida* CECT5279.

En la Figura 5.23 se comparan los resultados obtenidos al emplear una concentración total de biomasa de 2,1 g/L, tanto utilizando un biocatalizador simple formado por células de 9 h y la formulación del biocatalizador compuesto que ha sido seleccionada tras el estudio del apartado anterior. Se utilizan cinco parámetros como base de comparación entre ambos experimentos: el grado de desulfuración máximo, X_{BDS}^{max} , el tiempo para la máxima conversión, $t_{BDS}^{X_{BDS}^{max}}$, la velocidad inicial de eliminación de DBT, R_{DBT}^0 , la productividad máxima, P_{BDS}^{max} , y el grado de desulfuración específico E .

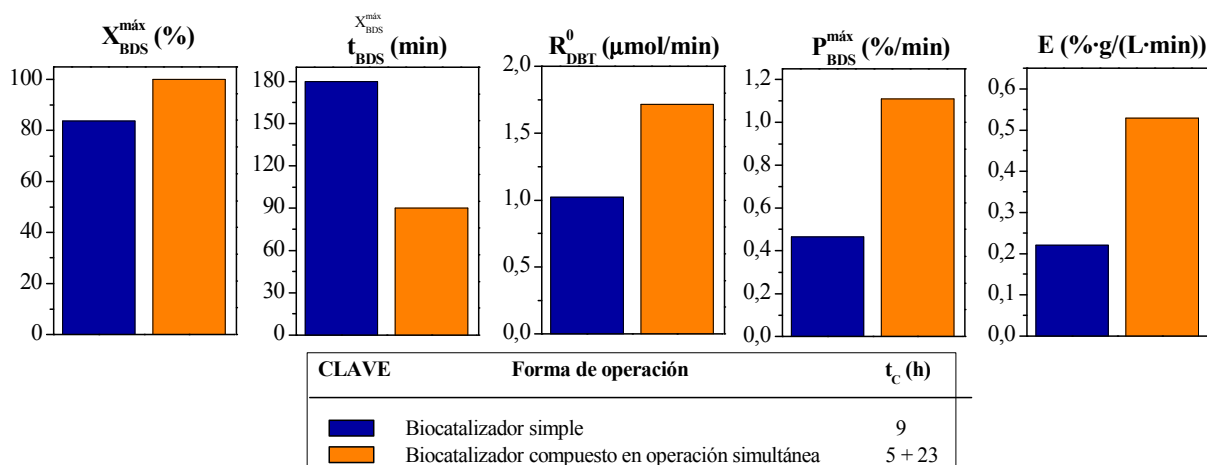


FIGURA 5.23 - Comparación entre la formulación óptima del biocatalizador compuesto y un biocatalizador simple de 9 h de edad y 2,1 g peso seco/L.

Desde el punto de vista del grado de desulfuración máximo alcanzado en el tiempo de los ensayos, se puede decir que el biocatalizador simple consigue una conversión de DBT en HBP del 83,64%, mientras que el biocatalizador compuesto logra la transformación total del DBT de partida. El tiempo empleado por las células de 9 h para alcanzar dicho valor de conversión fue de 180 min. Sin embargo, la combinación simultánea de células de 5 y 23 h logra, en la mitad de tiempo, 90 min, alcanzar un grado de desulfuración del 100%.

La velocidad inicial de eliminación de DBT que se consigue al emplear la mezcla seleccionada (1,714 $\mu\text{mol/L/min}$) supera notablemente el valor que proporciona el empleo de células de 9 h en una concentración de 2,1 g peso seco/L (1,022 $\mu\text{mol/L/min}$)

En cuanto a los valores de productividad máxima obtenidos con uno y otro biocatalizador, el experimento realizado con el biocatalizador de 9 h de edad dio lugar a un valor de 0,465 %/min, mientras que el biocatalizador compuesto, gracias a la elevada conversión conseguida en un tiempo tan reducido, logra superar el doble de este valor, alcanzando 1,111 %/min.

Al comparar dos experimentos con la misma concentración total de biomasa, la relación entre los valores del grado de desulfuración específico E guardan la misma relación que las respectivas productividades máximas alcanzadas. El empleo de células de 9 h da lugar a un valor de 0,221 %·g/L/min en el grado de desulfuración específico, mientras que el empleo de la formulación óptima del biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h alcanza los 0,529 %·g/L/min.

El empleo de este biocatalizador formado por la combinación simultánea de concentraciones de biomasa de 1,4 g/l para células de 23 h y 0,7 g/L para células de 5 h de tiempo de crecimiento, logra mejorar apreciablemente los resultados que se obtienen con células de 9 h de edad.

A continuación, en las Figuras 5.24 a 5.28 se compara los parámetros $X_{BDS}^{m\acute{a}x}$, $t_{BDS}^{X_{BDS}^{m\acute{a}x}}$, R_{DBT}^0 , $P_{BDS}^{m\acute{a}x}$ y E obtenidos al emplear la formulación óptima encontrada para el biocatalizador compuesto y las diferentes concentraciones de biomasa probadas para el biocatalizador simple de células de 9 h de edad.

Al comparar el grado de desulfuración alcanzado en ambas formas de operación, se observa que la conversión completa de DBT a HBP se alcanza al emplear

concentraciones de biomasa superiores a 2,1 g peso seco/L de células de 9 h, como se muestra en la Figura 5.24. Si bien, en todos los casos el tiempo de operación requerido es siempre menor al emplear células de 5 y 23 h de manera simultánea, como se observa en la Figura 5.25. El biocatalizador compuesto aventaja en todos los casos al biocatalizador simple (9h) en lo que se refiere a conseguir mayores valores de productividad máxima (1,111 %/min) y grado de desulfuración máximo (0,529 %·L/g/min), como se refleja en las Figuras 5.27 y 5.28, respectivamente. En la Figura 5.26 se muestra que tan sólo los biocatalizadores en que se ha empleado una concentración de biomasa de 3,5 y 4,2 g peso seco/L de células de 9 h de edad, superan en la velocidad inicial de eliminación de DBT (2,023 y 2,503 $\mu\text{mol/L/min}$, respectivamente) a los valores alcanzados por la mezcla de células seleccionada. A la vista de estos resultados, el biocatalizador compuesto da lugar a una desulfuración claramente más eficiente.

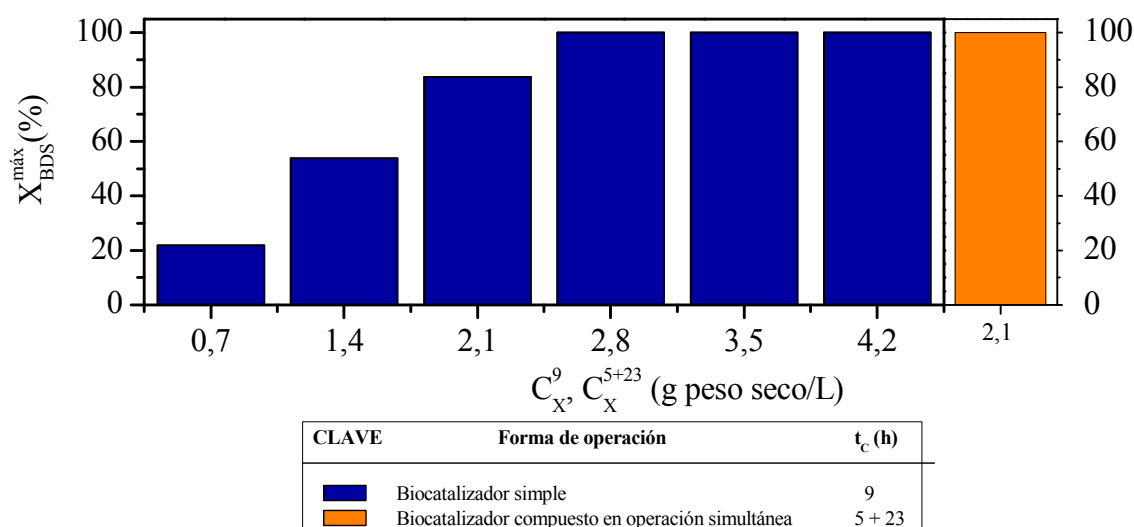


FIGURA 5.24 - Comparación del grado de desulfuración máximo alcanzado al emplear biocatalizadores simples de 9 h de concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g/L y un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h una vez optimizada su formulación.

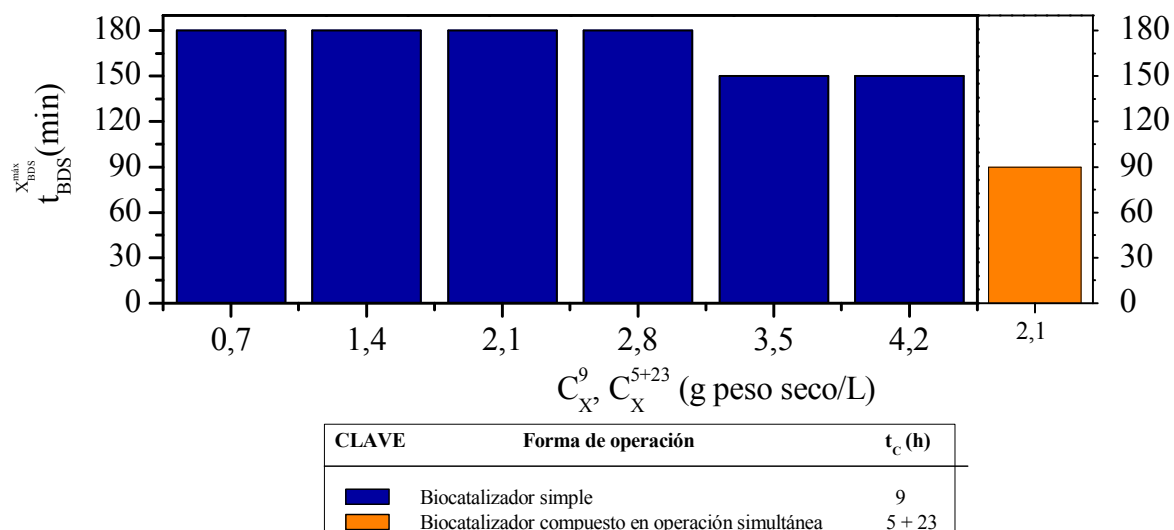


FIGURA 5.25 - Comparación del tiempo de conversión máxima alcanzado al emplear biocatalizadores simples de 9 h de concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g/L y un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h una vez optimizada su formulación.

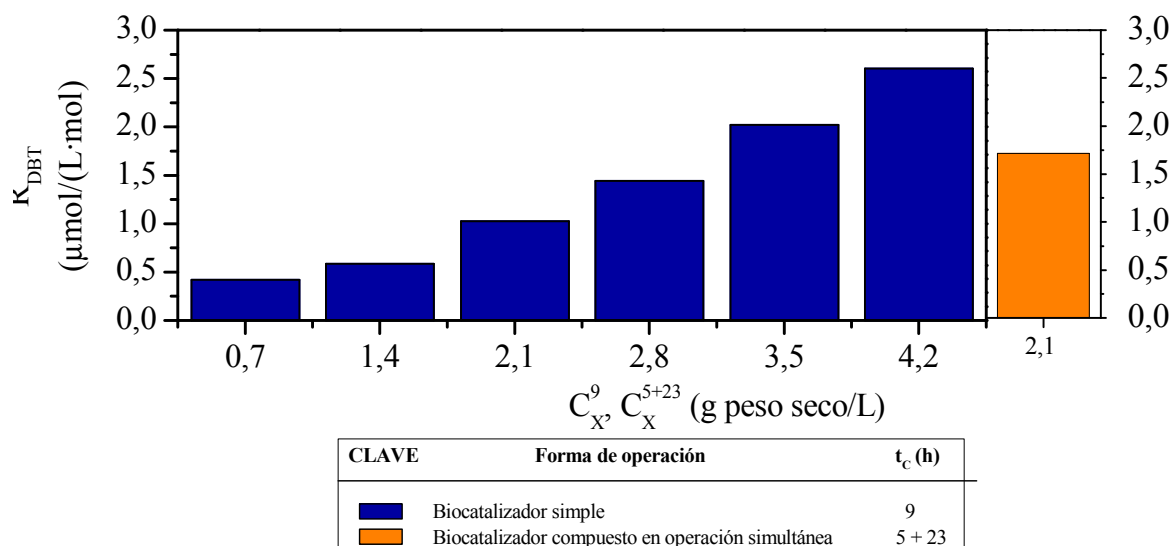


FIGURA 5.26 - Comparación de la velocidad inicial de eliminación de DBT obtenida al emplear biocatalizadores simples de 9 h de concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g/L y un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h una vez optimizada su formulación.

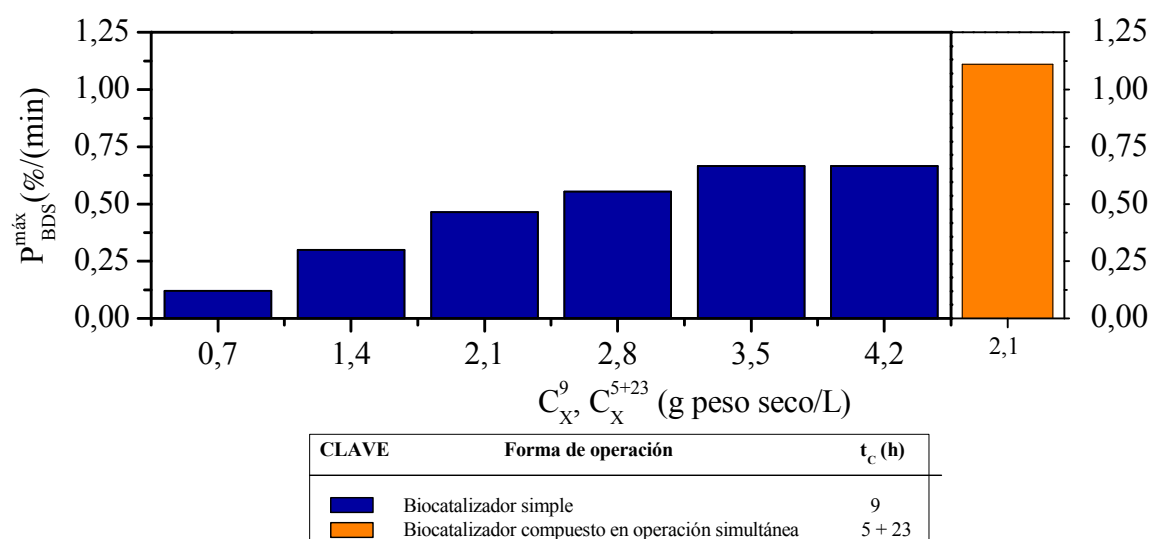


FIGURA 5.27 - Comparación de la productividad máxima alcanzado al emplear biocatalizadores simples de 9 h de concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g/L y un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h una vez optimizada su formulación.

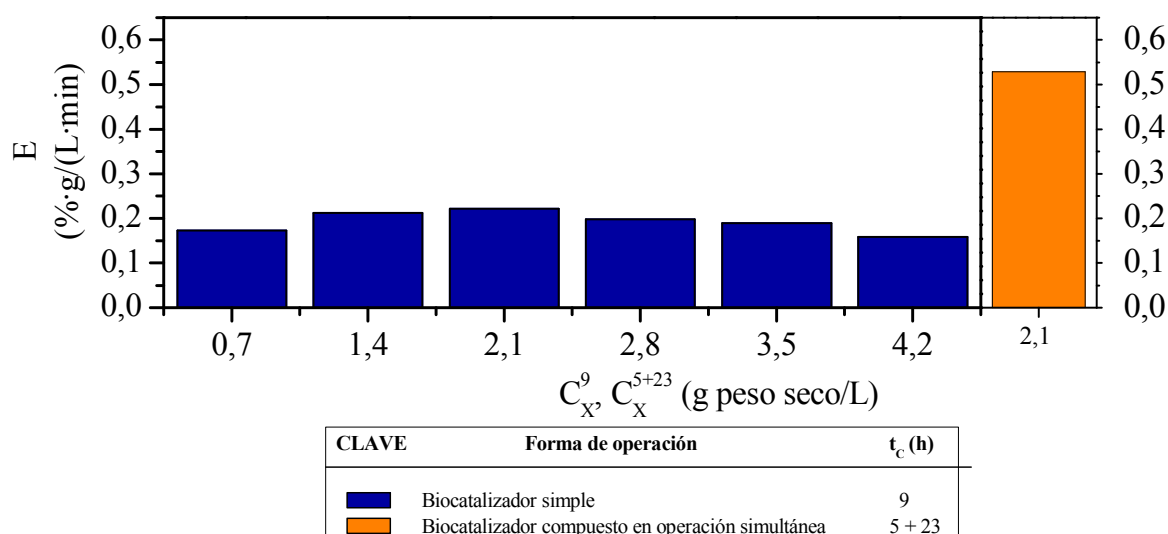


FIGURA 5.28 - Comparación del grado de desulfuración específico alcanzado al emplear biocatalizadores simples de 9 h de concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g/L y un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h una vez optimizada su formulación.

Finalmente, en las Figuras 5.29 a 5.33 se emplean los mismos parámetros para comparar el empleo de biocatalizadores compuestos por células de 5 y 23 h operando de manera secuencial y de forma simultánea. En el caso de combinar dos biocatalizadores simples de 23 y 5 h de edad de manera secuencial, se han indicado en las figuras la concentración de células de 23 h empleada en la primera etapa de la operación, para las diferentes concentraciones de biomasa total empleadas.

En la Figura 5.29 se observa que para igualar en una operación secuencial la conversión completa que se logra al emplear la mezcla simultánea de células seleccionada en este estudio, es necesario combinar células de 23 y 5 h en concentraciones de biomasa total superiores a 2,1 g peso seco/L. Sin embargo, en la Figura 5.30 se puede observar que la operación secuencial no logra, en ninguno de los casos, reducir el tiempo de operación tanto como la operación simultánea. En esta figura se refleja también que al aumentar la concentración de células de 23 h en la primera de las etapas secuenciales se consigue mejorar la eficiencia del proceso.

En la Figura 5.31, se puede observar que solamente el empleo de altas concentraciones totales de biomasa en operación secuencial logra igualar la velocidad inicial de eliminación de DBT alcanzada por la formulación optimizada en este estudio para un proceso simultáneo. Sólo en los casos en que se emplea una concentración de células de 23 h de edad de 2,1 g peso seco /L se puede competir con la mezcla seleccionada en velocidad de eliminación del compuesto de partida.

En las Figuras 5.32 y 5.33 se muestra, desde el punto de vista de la productividad máxima y del grado de desulfuración específico, respectivamente, que, de manera clara, la eficacia de la forma de operación secuencial es muy baja en comparación con los resultados obtenidos al utilizar el biocatalizador compuesto con células de dos edades de manera simultánea. El problema de trabajar de manera secuencial son los tiempos de operación tan altos, que hacen que la productividad máxima y el grado de desulfuración específico sean muy pequeños. Convendría optimizar el tiempo de operación de la primera fase en que se trabaja sólo con células de 23 h para hacer más eficaz esta forma de operación.

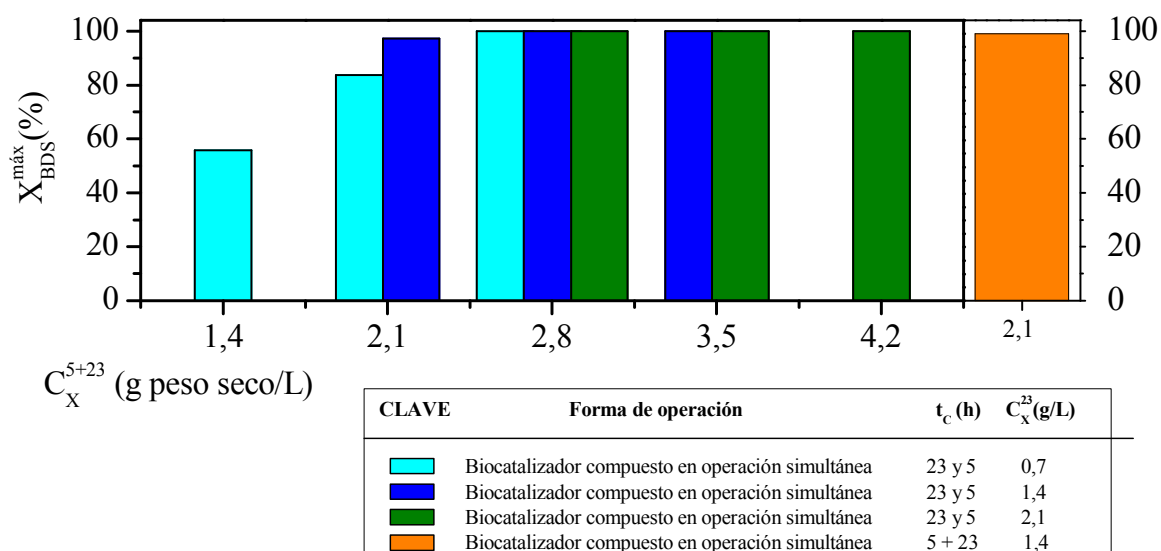


FIGURA 5.29 - Comparación del grado de desulfuración máximo alcanzado al emplear biocatalizadores compuestos por células de 5 y 23 h operando de manera secuencial y simultánea.

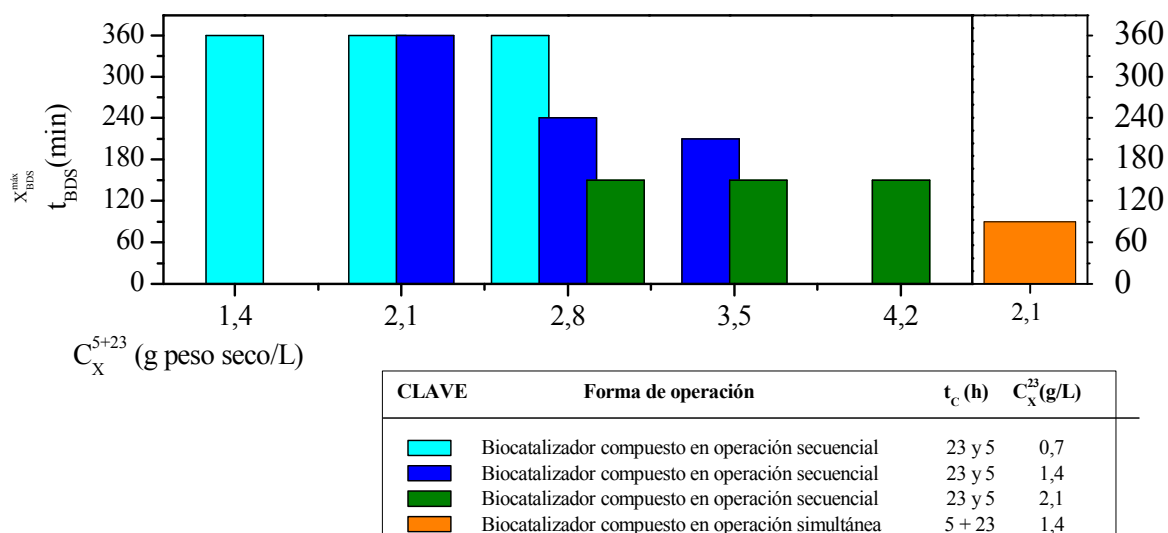


FIGURA 5.30 - Comparación del tiempo de conversión máxima alcanzado al emplear biocatalizadores compuestos por células de 5 y 23 h operando de manera secuencial y simultánea.

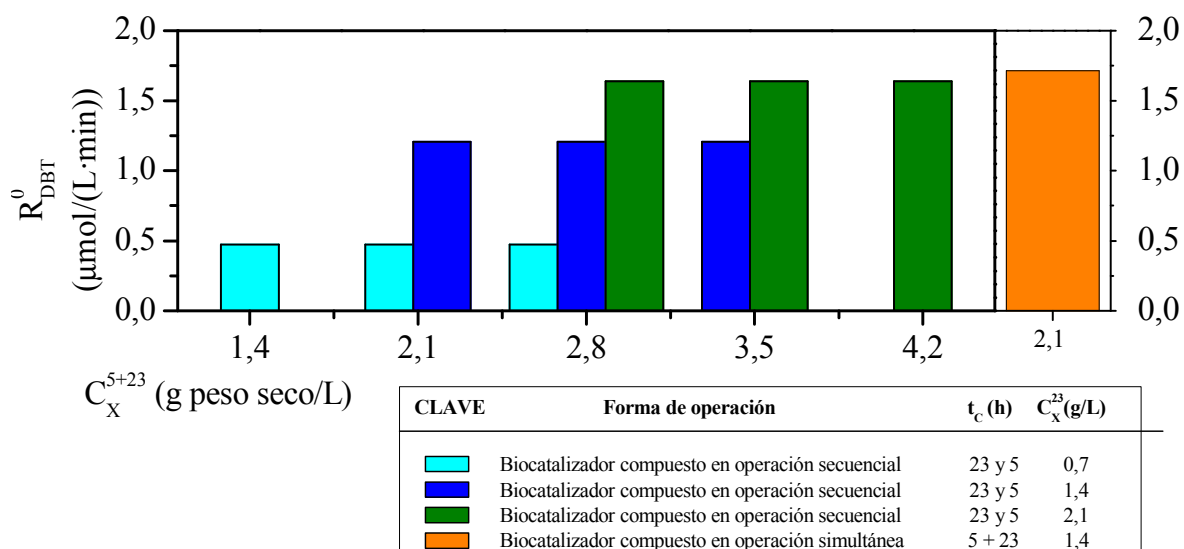


FIGURA 5.31 - Comparación de la velocidad inicial de eliminación de DBT obtenida al emplear biocatalizadores compuestos por células de 5 y 23 h operando de manera secuencial y simultánea.

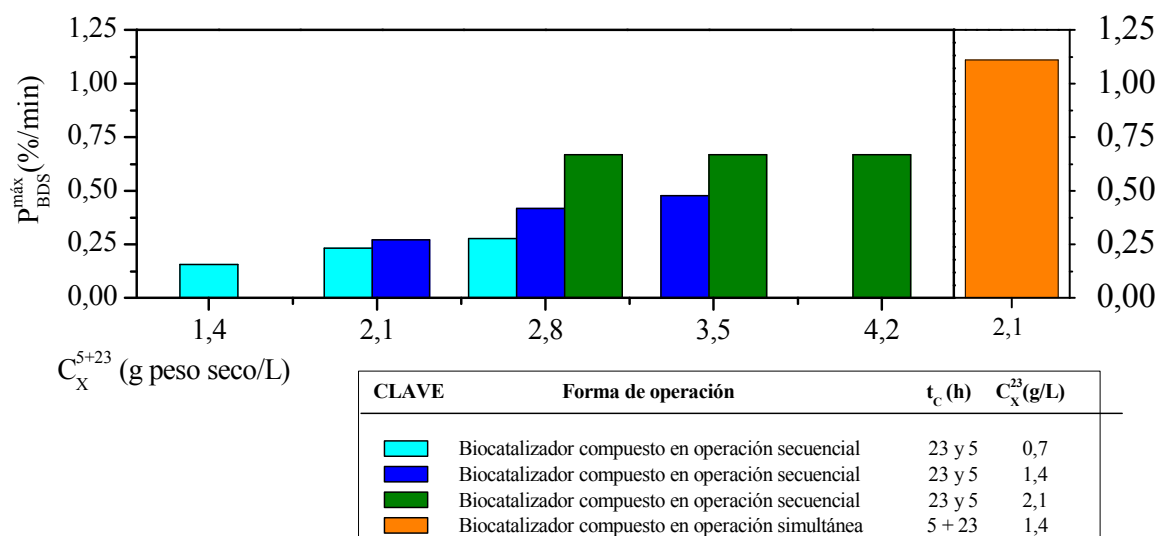


FIGURA 5.32 - Comparación de la productividad máxima alcanzada al emplear biocatalizadores compuestos por células de 5 y 23 h operando de manera secuencial y simultánea.

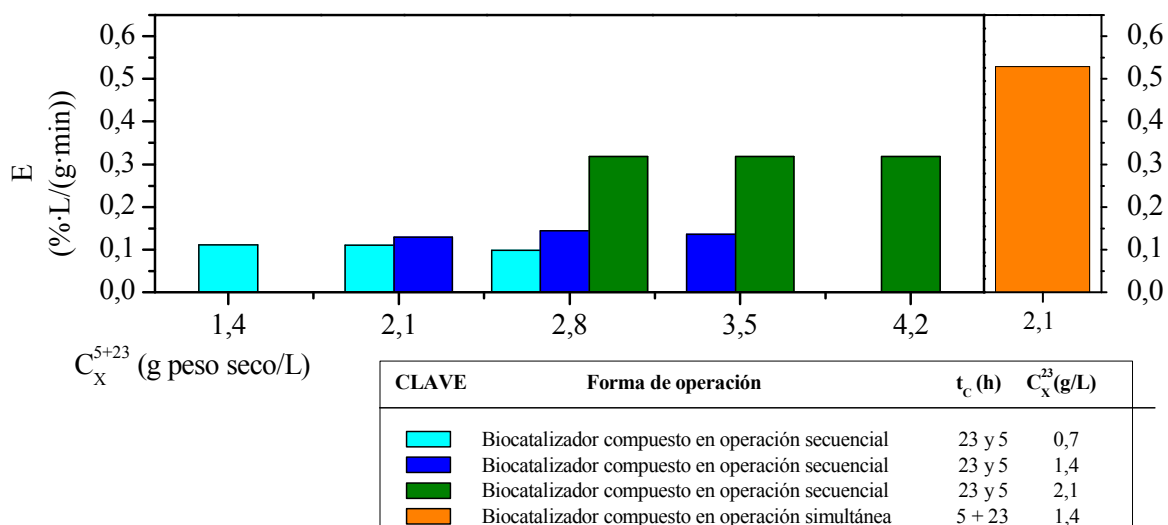


FIGURA 5.33 - Comparación del grado de desulfuración específico alcanzado al emplear biocatalizadores compuestos por células de 5 y 23 h operando de manera secuencial y simultánea.

Finalmente, se comparan los resultados obtenidos con un biocatalizador simple y la operación secuencial propuesta. En la Figura 5.34 se representan los valores obtenidos para la velocidad inicial de eliminación de DBT para los experimentos realizados con un biocatalizador simple de 9 h de edad y los valores obtenidos en combinaciones secuenciales de células de 23 y 5 h. Se ha representado el valor que se obtiene a partir de los datos de desaparición de DBT de la primera etapa de la operación y se han comparado situaciones equivalentes de concentración de biomasa. Estos valores generados en la primera etapa de estas combinaciones secuenciales son mayores que los obtenidos para las mismas concentraciones de biomasa en los experimentos con células de 9 h. El empleo de células de 23 h presenta ventajas sobre el de células de 9 h de tiempo de crecimiento en la eliminación de DBT por su elevada actividad en las enzimas monooxigenasas de la ruta 4S.

En la Figura 5.35 se comparan los valores de productividad máxima obtenidos tanto en experimentos con un biocatalizador simple de 9 h de edad como en combinaciones secuenciales de biocatalizadores de 23 y 5 h para equivalentes concentraciones totales de biomasa. En el caso de combinaciones secuenciales se indica,

además, la concentración empleada de células de 23 h en la primera etapa. No se han representado los ensayos en que la concentración de células de la primera etapa fue de 2,1 g peso seco/L, puesto que, como se ha comentado, en estos casos se alcanzó la conversión total a HBP durante el tiempo de la primera etapa sin que tuviera lugar realmente un proceso secuencial.

Se observa que, en ningún caso, la eficacia de las células de 9 h es superada por esta forma de operación combinando dos biocatalizadores simples de manera secuencial. Si bien, en la citada figura, se pone de manifiesto que al aumentar la concentración de células de 23 h en la primera etapa, para una misma concentración de biomasa total, se logra un proceso más eficiente, como se ha comentado previamente. Igualmente, se ha justificado que esta menor eficacia se debe a un tiempo de operación más elevado en las operaciones secuenciales llevadas a cabo, y se ha señalado la desventaja de existir una operación de separación entre las dos etapas propuestas.

Por estos motivos, se decide continuar con el estudio de formas de operación propuestas, considerando la combinación de células de 5 y 23 h de manera simultánea, como se aborda en los apartados siguientes de la presente Memoria.

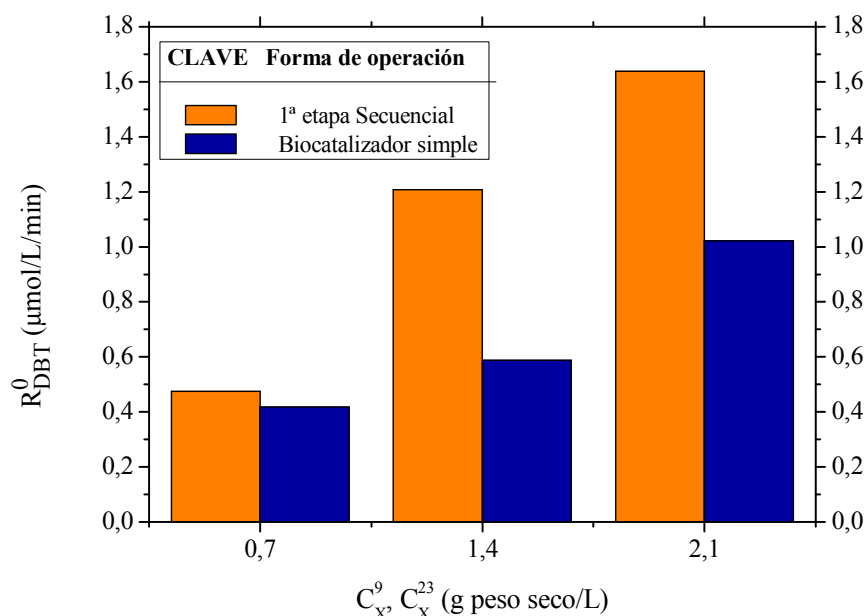


FIGURA 5.34 Comparación de la velocidad inicial de eliminación de DBT empleando un biocatalizador simple de 9 h y dos biocatalizadores de 23 y 5 h de manera secuencial.

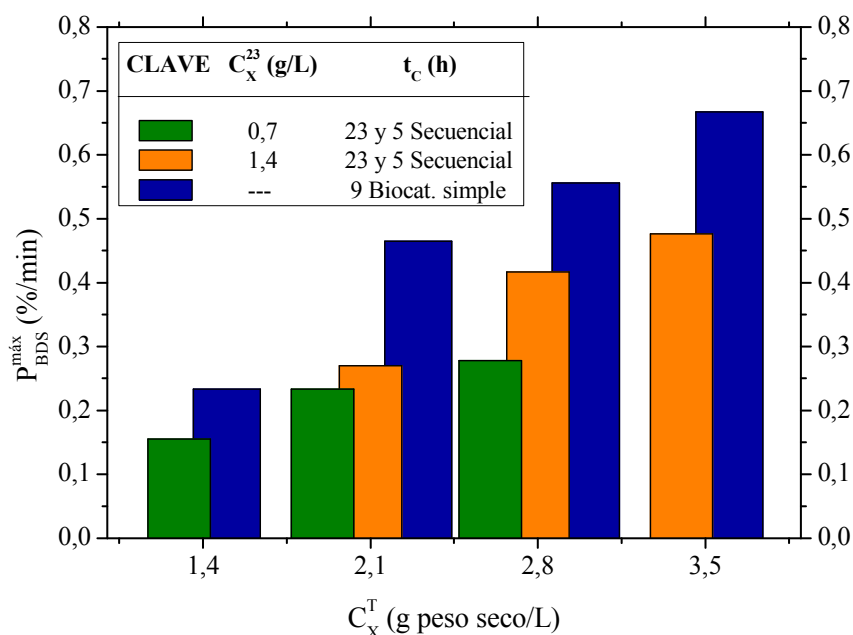


FIGURA 5.35 - Comparación de la productividad máxima empleando un biocatalizador simple de 9 h y dos biocatalizadores de 23 y 5 h de manera secuencial.

En general, la desulfuración en condiciones de *resting cells* mediante un biocatalizador compuesto, combinando simultáneamente células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento, proporciona resultados mucho más eficientes que los obtenidos al trabajar con un biocatalizador simple, con células de 9 h de tiempo de crecimiento y al operar de manera secuencial, primero con células 23 h y después con células de 5 h, o al trabajar en desulfuración durante el crecimiento. La mezcla de células seleccionada logra, no sólo los mejores resultados entre las otras combinaciones simultáneas estudiadas, sino también la mayor velocidad de eliminación y conversión de DBT y en el menor tiempo de operación con respecto a las otras formas de operación estudiadas, permitiendo un mejor aprovechamiento de la biomasa utilizada.

6. MODELO CINÉTICO

6 MODELO CINÉTICO

En el presente capítulo se aborda el desarrollo de un modelo cinético para describir la evolución de los compuesto implicados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) a lo largo del tiempo en la desulfuración de DBT, empleando biocatalizadores compuestos por células de *Pseudomonas putida* CECT5279. Como se ha descrito en el Capítulo 5 de la presente Memoria, estos biocatalizadores pueden consistir en la combinación simultánea de diferentes concentraciones de biomasa de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento.

Un modelo cinético consiste en la definición de ecuaciones que relacionan velocidades y concentraciones de productos y reactivos, que, integradas en un balance de materia, permiten la predicción de la conversión de los sustratos y el rendimiento de cada producto en unas condiciones de operación dadas. Su utilidad reside en la capacidad para describir, y por tanto predecir, el comportamiento de un sistema microbiano (Nielsen y Villadsen, 1992).

En este caso se pretende formular un modelo matemático que, en función de las concentraciones de biomasa correspondientes a células de dos tiempos de crecimiento, permita estimar los perfiles de concentración de los principales compuestos implicados en la ruta de desulfuración 4S.

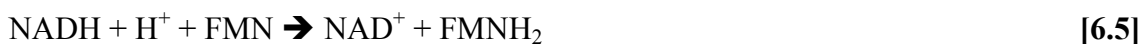
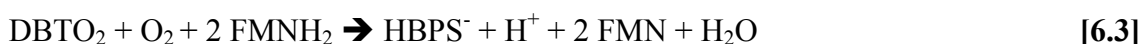
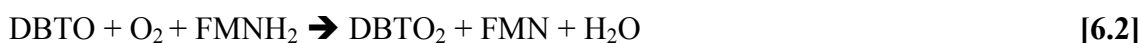
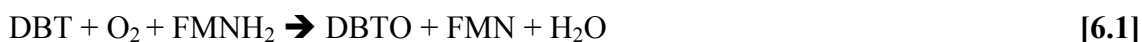
La formulación de un modelo cinético implica las siguientes etapas:

- 1.- Estudio estequiométrico del sistema de reacciones.
- 2.- Propuesta de un esquema de reacción.
- 3.- Asignación de ecuaciones cinéticas para cada reacción del esquema.
- 4.- Formulación de modelos cinéticos.
- 5.- Determinación de valores de los parámetros del modelo mediante el ajuste a datos experimentales.
- 6.- Discriminación de modelos mediante la aplicación de criterios estadísticos y físicos a los parámetros que se obtienen.

Como se comentó en el capítulo de Introducción, *Pseudomonas putida* CECT5279 es capaz de eliminar DBT a través de la ruta 4S, por ser un microorganismo recombinante en el que se han insertado los genes dszABC procedentes de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 que codifican esta ruta metabólica (Galán y col., 2000)

La ruta 4S implica diferentes compuestos, tales como DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS, HBP, O₂, H₂O, SO₃⁼, NADH, NAD⁺, FMN y FMNH₂ (Gray y col., 1996 , Oldfield y col., 1997). Mediante un **estudio estequiométrico**, a través de la aplicación del algoritmo Gauss-Jordan sobre la matriz elementos-especies químicas (Schubert y Hofmann, 1976), se puede conocer el número de compuestos clave, que en este caso resulta ser cuatro, y la variación del número de moles de todos los compuestos en función de cuatro escogidos como clave (Hernández del Olmo, 2004 y Martín, 2005).

El **esquema de reacción** correspondiente a la ruta 4S se muestra en la Figura 1.13 del Capítulo 1 de la presente Memoria. Consiste en cuatro reacciones en serie y una reacción paralela que aporta el poder reductor en forma de FMNH₂ a las primeras tres reacciones en serie, representadas en el esquema de reacción de las ecuaciones [6.1] a [6.5] (Oldfield y col., 1997).



En estudios previos del grupo de investigación FQPIMA, se realizaron medidas de la concentración de cofactores reducidos (FMNH₂) y se demostró que la concentración presente en el citoplasma de éstos no limita la velocidad global del proceso de desulfuración (Alcón y col., 2005) Por este motivo, este esquema de reacción se puede simplificar a uno nuevo, formado por las cuatro reacciones en serie simplificadas, recogidas en las expresiones [6.6] a [6.9]



En otro estudio del grupo FQPIMA, se plantearon **ecuaciones cinéticas** para describir la velocidad de las cuatro reacciones del esquema citado considerando hasta un tiempo de 90 minutos de ensayo. Para las tres primeras reacciones de la ruta 4S, se obtuvieron cinéticas tipo Michaelis–Menten según las expresiones [6.10], [6.11] y [6.12], y se determinó que la última reacción respondía a una cinética de inhibición competitiva por producto, en este caso por HBP, según la expresión [6.13] (Alcón y col., 2008)

$$r_1 = \frac{k_1 \cdot C_{DBT}}{K_1 + C_{DBT}} \quad [6.10]$$

$$r_2 = \frac{k_2 \cdot C_{DBTO}}{K_2 + C_{DBTO}} \quad [6.11]$$

$$r_3 = \frac{k_3 \cdot C_{DBTO_2}}{K_3 + C_{DBTO_2}} \quad [6.12]$$

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot C_{HBPS}}{K_4 \left(1 + \frac{C_{HBP}}{K_I} \right) + C_{HBPS}} \quad [6.13]$$

6.1 Formulación del modelo cinético

En el presente estudio se propone una generalización del modelo anterior para intentar describir la evolución de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP durante tiempos prolongados de ensayo, e incluyendo la concentración de biomasa como variable en el mismo. Los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo, especialmente en los casos en que se emplearon bajas concentraciones de biomasa (0,7 g peso seco/L), presentan una tendencia saturante. La incorporación de esta observación experimental en el modelo cinético se ha realizado considerando la existencia de una pérdida de actividad de las enzimas involucradas en la ruta mediante una cinética de primer orden, como se presenta en las ecuaciones [6.14] a [6.17].

$$r_1 = \frac{k_1 \cdot \exp(-S_1 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{K_1 + C_{DBT}} \quad [6.14]$$

$$r_2 = \frac{k_2 \cdot \exp(-S_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{K_2 + C_{DBTO}} \quad [6.15]$$

$$r_3 = \frac{k_3 \cdot \exp(-S_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{K_3 + C_{DBTO_2}} \quad [6.16]$$

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot \exp(-S_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{K_4 \left(1 + \frac{C_{HBP}}{K_I} \right) + C_{HBPS}} \quad [6.17]$$

Para evitar los problemas de convergencia en el ajuste que generan estas expresiones hiperbólicas, se ha decidido transformar las ecuaciones [6.14] a [6.17] en las que aparecen a continuación como [6.18] a [6.21]. Para ello, se ha dividido numerador y denominador de cada una de estas expresiones por el parámetro de afinidad por el sustrato de cada reacción, K_i .

$$r_1 = \frac{k_1' \cdot \exp(-S_1 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K_1' \cdot C_{DBT}} \quad [6.18]$$

$$r_2 = \frac{k_2' \cdot \exp(-S_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K_2' \cdot C_{DBTO}} \quad [6.19]$$

$$r_3 = \frac{k_3' \cdot \exp(-S_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K_3' \cdot C_{DBTO_2}} \quad [6.20]$$

$$r_4 = \frac{k_4' \cdot \exp(-S_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K_5' \cdot C_{HBP} + K_4' \cdot C_{HBPS}} \quad [6.21]$$

Mediante la expresión [6.22], se pueden relacionar las velocidades de reacción y las velocidades de producción de cada compuesto clave, R_j . De esta manera, es posible expresar la velocidad de producción de cada uno de estos compuestos en función de las expresiones [6.18] a [6.21], tal como se muestra en las ecuaciones [6.23] a [6.27].

$$R_j = \sum_{i=1}^{NC} \nu_{ij} \cdot r_j, (j=1 \dots NC) \quad [6.22]$$

$$R_{DBT} = \frac{dC_{DBT}}{dt} = -r_1 \quad [6.23]$$

$$R_{DBTO} = \frac{dC_{DBTO}}{dt} = r_1 - r_2 \quad [6.24]$$

$$R_{DBTO_2} = \frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = r_2 - r_3 \quad [6.25]$$

$$R_{HBPS} = \frac{dC_{HBPS}}{dt} = r_3 - r_4 \quad [6.26]$$

$$R_{HBP} = \frac{dC_{HBP}}{dt} = r_4 \quad [6.27]$$

Así, para cada compuesto se obtiene una ecuación diferencial según las expresiones [6.28] a [6.32], quedando definido de esta manera el modelo que se va a utilizar para describir la desulfuración de DBT en condiciones de *resting cells*, empleando células de *Pseudomonas putida* CECT5279 como biocatalizador.

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = -\frac{k_1 \cdot \exp(-S_1 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K_1 \cdot C_{DBT}} \quad [6.28]$$

$$\frac{dC_{DBTO}}{dt} = \frac{k_1 \cdot \exp(-S_1 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K_1 \cdot C_{DBT}} - \frac{k_2 \cdot \exp(-S_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K_2 \cdot C_{DBTO}} \quad [6.29]$$

$$\frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = \frac{k_2 \cdot \exp(-S_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K_2 \cdot C_{DBTO}} - \frac{k_3 \cdot \exp(-S_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K_3 \cdot C_{DBTO_2}} \quad [6.30]$$

$$\frac{dC_{HBPS}}{dt} = \frac{k_3 \cdot \exp(-S_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K_3 \cdot C_{DBTO_2}} - \frac{k_4 \cdot \exp(-S_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K_5 \cdot C_{HBP} + K_4 \cdot C_{HBPS}} \quad [6.31]$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \frac{k_4 \cdot \exp(-S_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K_5 \cdot C_{HBP} + K_4 \cdot C_{HBPS}} \quad [6.32]$$

Se trata, por tanto de un modelo en múltiple respuesta formado por cinco ecuaciones diferenciales acopladas. A continuación se presenta el trabajo dirigido a la determinación de los parámetros cinéticos y a la aplicación de criterios estadísticos y físicos para la formulación de este modelo.

6.2 Resultados experimentales

Para la determinación del modelo es necesaria la obtención de datos experimentales a partir de experimentos diseñados con ese fin. Para ello, se han empleado dos biocatalizadores simples: uno formado por células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de 5 h de tiempo de crecimiento, y otro por células de 23 h de edad.

A fin de cubrir un intervalo suficientemente amplio de concentraciones de biomasa, se han llevado a cabo ensayos de desulfuración empleando seis diferentes concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g peso seco/L. Para la obtención de células, se ha seguido un protocolo estandarizado a fin de tener resultados repetitivos (Martín y col., 2004 y 2005), según la metodología que se describe en el Apartado 2.2.2.1 de la presente Memoria. Siguiendo dicho protocolo, se han obtenido muestras de células de 5 y 23 h de edad crecidas en un fermentador de 2 L, que se han procesado y conservado para su empleo en ensayos de desulfuración de DBT en condiciones de reposo celular. Las condiciones y protocolos para llevar a cabo estos ensayos de desulfuración se describen en el Apartado 2.2.2.2. En estos experimentos se empleó una concentración inicial de DBT de 25 μM y concentraciones de biomasa de 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 y 4,2 g peso seco/L. El tiempo total de duración de estos experimentos fue 180 min. En la Tabla 6.1 se esquematiza la planificación experimental realizada con células de cada edad (5 y 23 h) en las seis concentraciones de biomasa que se han enumerado.

A continuación se recopilan los resultados experimentales obtenidos para cada uno de los experimentos realizados. A lo largo del tiempo se obtuvieron muestras del caldo, que se recogieron en tubos *Eppendorf* sobre acetonitrilo, se centrifugaron y acidificaron, como se describe en el Apartado 2.2.2.2 de esta Memoria. Estas muestras se analizaron mediante cromatografía HPLC, según la metodología que se describe en el Apartado 2.2.1.4. De esta manera, se obtuvo la evolución de la concentración de cada uno de los compuestos implicados en la ruta 4S a lo largo del tiempo que se recoge para cada experimento en las Tablas 6.2 a 6.13.

TABLA 6.1 - Planificación experimental para la desulfuración de DBT con biocatalizadores simples de dos tiempos de crecimiento.

Código	C_X^{5}	C_X^{23}
	(g peso seco/L)	(g peso seco/L)
BS-1	0,7	0,0
BS-2	1,4	0,0
BS-3	2,1	0,0
BS-4	2,8	0,0
BS-5	3,5	0,0
BS-6	4,2	0,0
BS-7	0,0	0,7
BS-8	0,0	1,4
BS-9	0,0	2,1
BS-10	0,0	2,8
BS-11	0,0	3,5
BS-12	0,0	4,2

TABLA 6.2 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-1

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	22,01	1,68	1,21	0,00	0,05
30	19,80	3,18	2,13	0,00	0,28
45	18,62	3,65	2,56	0,00	0,67
60	17,76	3,96	2,79	0,00	1,13
90	15,57	4,31	3,65	0,43	1,89
120	13,07	4,30	3,97	0,83	2,68
150	11,09	4,24	4,80	1,27	3,39
180	9,10	4,20	5,00	2,13	3,76

TABLA 6.3 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-2.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	19,99	2,84	0,55	0,30	0,52
30	15,85	3,99	3,21	0,46	1,87
45	11,85	4,36	5,32	0,37	2,68
60	9,40	4,26	6,89	0,73	3,90
90	6,42	3,57	8,77	0,89	5,23
120	4,40	2,56	9,47	1,58	6,90
150	2,65	1,95	8,83	3,75	8,12
180	1,59	1,32	6,96	5,50	9,02

TABLA 6.4 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-3.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	15,77	3,21	1,66	0,66	3,01
30	8,17	3,25	6,35	0,75	5,89
45	5,00	1,90	10,12	0,41	6,96
60	1,85	0,77	12,64	0,48	8,55
90	0,00	0,00	12,55	0,70	11,55
120	0,00	0,00	9,98	1,16	14,91
150	0,00	0,00	6,15	1,50	17,54
180	0,00	0,00	2,75	1,60	20,42

TABLA 6.5 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-4.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	21,97	1,98	0,74	0,00	0,23
15	12,88	3,21	4,00	0,00	3,25
30	4,35	2,67	9,57	0,00	7,54
45	0,00	0,70	12,18	0,00	11,76
60	0,00	0,00	9,81	0,20	15,13
90	0,00	0,00	3,19	2,44	18,89
120	0,00	0,00	1,21	0,77	22,38
150	0,00	0,00	0,50	0,00	24,60
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 6.6 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-5.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	18,66	4,35	1,29	0,00	0,00
15	5,01	5,21	6,23	1,35	6,82
30	0,00	0,00	11,05	0,79	12,34
45	0,00	0,00	7,70	0,41	16,94
60	0,00	0,00	1,97	0,93	21,43
90	0,00	0,00	0,00	0,50	24,70
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 6.7 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-6.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	12,56	4,19	2,57	0,50	6,24
15	4,48	2,99	6,10	2,00	11,15
30	0,00	0,00	6,98	1,43	16,52
45	0,00	0,00	3,57	0,70	20,54
60	0,00	0,00	0,00	0,50	22,71
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 6.8 -Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-7.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	24,02	1,96	0,00	0,00	0,05
10	22,03	2,93	0,00	0,27	0,10
15	20,00	3,52	0,48	0,78	0,24
30	15,79	4,35	1,89	1,48	0,57
45	12,42	4,32	3,63	2,16	1,00
60	9,65	4,23	5,88	2,94	1,35
90	4,30	4,02	9,62	4,63	1,88
120	1,57	2,88	11,31	6,18	2,53
150	0,49	1,91	10,68	8,79	2,88
180	0,00	1,37	9,61	10,49	3,21

TABLA 6.9 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-8.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	13,88	2,11	2,62	0,98	5,28
30	5,08	1,97	4,12	3,48	10,77
45	1,35	0,47	3,24	4,10	15,00
60	0,21	0,00	0,99	4,32	19,01
90	0,00	0,00	0,00	3,19	22,15
120	0,00	0,00	0,00	2,94	24,00
150	0,00	0,00	0,00	3,32	24,00
180	0,00	0,00	0,00	1,18	24,00

TABLA 6.10 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-9.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO_2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	11,78	2,49	2,39	1,42	12,13
30	2,27	0,63	0,94	1,66	19,71
45	0,43	0,00	0,25	2,07	22,53
60	0,00	0,00	0,00	1,70	23,54
90	0,00	0,00	0,00	0,95	23,50
120	0,00	0,00	0,00	0,00	24,35
150	0,00	0,00	0,00	0,00	24,23
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 6.11 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-10.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	17,51	1,22	2,21	0,75	3,40
10	10,06	1,02	3,11	1,68	9,76
15	3,31	0,36	1,65	2,66	17,20
30	1,12	0,00	0,00	2,72	21,43
45	0,22	0,00	0,00	1,29	23,17
60	0,00	0,00	0,00	0,68	24,43
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 6.12 - Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-11.

t_{BDS}	C_{DBT}	C_{DBTO}	C_{DBTO2}	C_{HBPS}	C_{HBP}
(min)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	15,00	1,62	5,99	0,57	0,27
15	5,24	0,88	7,01	2,10	10,74
30	0,86	0,00	0,25	3,75	20,60
45	0,00	0,00	0,00	1,71	23,14
60	0,00	0,00	0,00	0,82	24,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

TABLA 6.13 -Resultados obtenidos de la evolución de los intermedios de la Ruta 4S en el experimento BS-12.

t_{BDS} (min)	C_{DBT} (μM)	C_{DBTO} (μM)	C_{DBTO_2} (μM)	C_{HBPS} (μM)	C_{HBP} (μM)
0	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	11,01	1,58	7,55	0,35	4,14
15	3,93	0,66	6,35	0,63	12,64
30	0,05	0,00	2,45	1,40	20,75
45	0,00	0,00	0,00	1,02	24,78
60	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00

A fin de conocer la bondad de los datos experimentales obtenidos, se ha estimado el error asociado a dichos valores experimentales. Este error se ha calculado en base al balance de carbono en la ruta 4S, que se puede realizar con datos experimentales puesto que se está midiendo un compuesto más que los claves (HBPS, en este caso). De esta manera, puesto que no hay limitaciones al transporte a través de la membrana celular para ninguno de los compuestos que participan en dicha ruta (Alcón y col., 2005), y al cumplirse en todos estos experimentos que $t=0 \therefore C_{DBTO}^0 = C_{DBTO_2}^0 = C_{HBPS}^0 = C_{HBP}^0 = 0$, se debe verificar la ecuación [6.33], que se muestra a continuación:

$$C_{DBT}^0 = C_{DBT} + C_{DBTO} + C_{DBTO_2} + C_{HBPS} + C_{HBP} \quad [6.33]$$

De acuerdo con lo anterior, se ha definido el error en cada dato experimental como la desviación de este balance en las medidas experimentales según la expresión [6.34]

$$Error = \frac{\left(C_{DBT}^0 - \sum_j C_j^{exp} \right)}{C_{DBT}^0} \cdot 100, j = DBT, DBTO, DBTO_2, HBPS, HBP \quad [6.34]$$

A continuación, en las Figuras 6.1 y 6.2, se representa el error asociado a los datos de experimentos obtenidos al emplear células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento, respectivamente, a lo largo del tiempo.

Para ninguno de los datos experimentales obtenidos se tienen errores calculados superiores al 10%. En dos casos particulares, con células de 5 h de edad, en una concentración de 4,2 g peso seco/L y empleando células de 23 h de edad en una concentración de 2,1 g peso seco/L, se han obtenido errores elevados del 9,74 % y del 9,16 %, respectivamente. Este error experimental presenta valores repartidos de manera homogénea por exceso y por defecto sobre el valor teórico del balance de materia. Si bien, el error es, en términos generales, mayor a tiempos cortos de ensayo, debido al mayor número de compuestos de la ruta 4S en pequeñas concentraciones que se detectan en los primeros momentos de los ensayos. En general, el error se encuentra alrededor del 5%. Sólo en casos aislados se ha superado ese valor, como se observa en las Figuras 6.1 y 6.2.

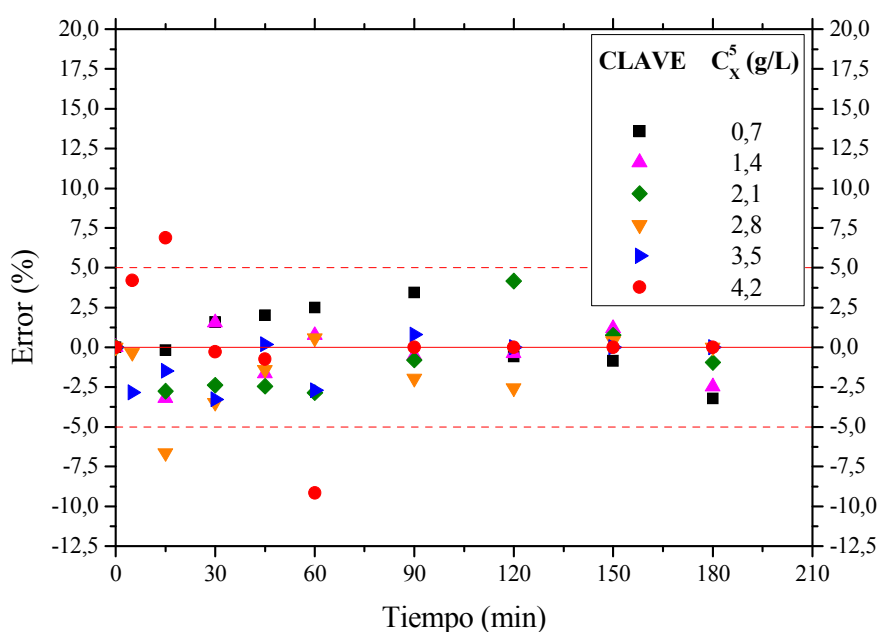


FIGURA 6.1 - Evolución del error a lo largo del tiempo para los datos experimentales obtenidos con células de 5 h de tiempo de crecimiento.

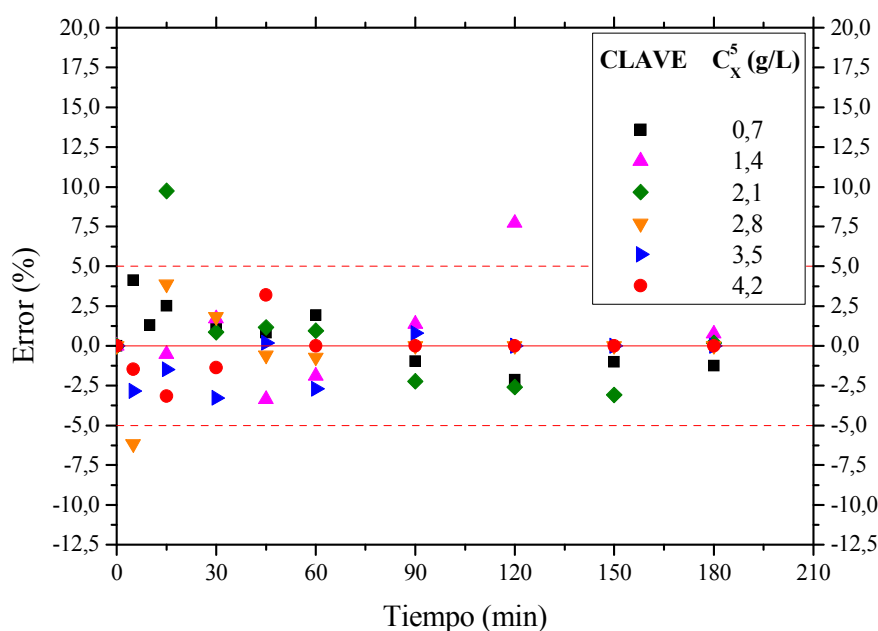


FIGURA 6.2 - Evolución del error a lo largo del tiempo para los datos experimentales obtenidos con células de 23 h de tiempo de crecimiento.

6.3 Determinación de los parámetros cinéticos

Tanto la comprobación de la bondad de las ecuaciones cinéticas planteadas, como la determinación de los parámetros óptimos que representan la cinética del sistema estudiado, se van a llevar a cabo siguiendo el siguiente esquema de cálculo:

- En primer lugar se van a obtener valores discretos de la velocidad de cada una de las reacciones de la ruta empleando las ecuaciones [6.35] y [6.36], correspondientes a la aplicación del método de velocidades de reacción en su forma integral.

$$\int_{t_0}^t r_i \cdot dt = \sum_{j=1}^{NC} v_{ij} \cdot (C_j - C_j^0) \quad [6.35]$$

$$r_i = \frac{d\left(\int_{t_0}^t r_i \cdot dt\right)}{dt} \quad [6.36]$$

- Posteriormente, se van a determinar las ecuaciones cinéticas más adecuadas para cada una de las reacciones implicadas en la ruta 4S a partir de los valores discretos de velocidades de reacción obtenidos en el paso anterior.

Para ello se van a considerar dos posibilidades consistentes en la inclusión o no de la desactivación en las ecuaciones cinéticas de cada una de las reacciones consideradas.

- Después, se van a ajustar las ecuaciones cinéticas obtenidas a los datos experimentales, mediante el empleo de regresiones no lineales en simple respuesta, obteniendo valores de los parámetros cinéticos del modelo que se emplean en la siguiente etapa del cálculo como valores iniciales del algoritmo de regresión.
- Y, finalmente, se van a determinar los valores óptimos de los parámetros cinéticos empleando el método de velocidades de producción en su forma integral, según se recoge en la ecuación [6.37], realizando un ajuste de tipo no lineal en múltiple respuesta del modelo a los datos experimentales previamente obtenidos, considerando las ecuaciones cinéticas determinadas para cada una de las reacciones involucradas en la ruta 4S.

$$C_j - C_j^0 = \sum_{i=1}^{NC} \nu_{ij} \cdot \int_{t_0}^t r_i \cdot dt \quad [6.37]$$

Así, en este estudio se ha planteado la aplicación previa del método de velocidades de reacción como primera aproximación en los cálculos, para finalmente emplear el método de velocidades de producción (Himmelblau y col., 1967).

En todos los casos, los datos con los que se trabaja son integrales, por lo que el desarrollo del modelo cinético se ha llevado a cabo mediante la aplicación del método integral de cálculo, al emplear tanto la metodología con velocidades de producción como con velocidades de reacción, tal como se describe en el Apartado 2.3 de la presente Memoria.

Se ha preferido el empleo de un método de cálculo integral a uno diferencial por la mayor precisión que presentan los primeros frente a los segundos (García-Ochoa y col., 1990) Esto se debe a que los métodos diferenciales se basan en el cálculo de derivadas a partir de la evolución de datos experimentales de concentración frente al tiempo, generalmente, mediante su ajuste previo a diferentes funciones que se derivan analíticamente. De esta manera, las ecuaciones diferenciales se transforman en ecuaciones algebraicas y se calculan los parámetros buscados a través de una segunda regresión. El empleo de las técnicas de derivación y de dos regresiones da lugar a errores mayores, afectando así a los límites de confianza obtenidos en los parámetros

calculados (García-Ochoa y col., 1992). Sin embargo, en el método integral, se realiza una integración previa de las ecuaciones diferenciales antes de realizar el ajuste de datos (Font y Fabregat, 1995), por lo que el error asociado a este método de cálculo es menor.

A continuación, se describe la aplicación del método de velocidades de reacción y de velocidades de reacción y de velocidades de producción al modelo propuesto. En ambos casos, el *software* empleado ha sido Aspen Custom Modeler®, y el método numérico de integración que se ha escogido es el método implícito de Euler con paso variable (Gautschi, 1997), como se describe en el Apartado 2.3 de la presente Memoria.

6.3.1 MÉTODO DE VELOCIDADES DE REACCIÓN

Como primera aproximación a los valores de los parámetros cinéticos, se ha aplicado el método de velocidades de reacción a las reacciones de la ruta 4S, mediante regresión no lineal de simple respuesta, como se describe en el Apartado 2.3 de la presente Memoria. Se han escogido los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP como compuestos clave de cada una de las reacciones del esquema simplificado que se muestra en las expresiones [6.6] a [6.9]. El método de velocidades de reacción permite simplificar el cálculo de parámetros y, en este caso, se puede aplicar al coincidir el número de componentes clave y el número de reacciones del esquema de reacción, según la expresión matricial [2.11] (García-Ochoa, y col., 1992).

$$\dot{r} = \dot{v} \cdot R^{-1} \cdot \dot{r} \quad [2.11]$$

Según el esquema de reacción simplificado de la ruta 4S que forman las ecuaciones [6.6] a [6.9], la matriz de coeficientes estequiométricos y su inversa son, respectivamente, las que se muestran a continuación en las expresiones [6.38] y [6.39].

$$\dot{v} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad [6.38]$$

$$\dot{v}^{-1} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad [6.39]$$

De esta manera, la expresión general del método de velocidades de reacción [2.11] puede escribirse como aparece en la ecuación [6.40], particularizada para el sistema de reacción estudiado en la presente Memoria.

$$\begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R_{DBT} \\ R_{DBTO} \\ R_{DBTO_2} \\ R_{HBP} \end{pmatrix} \quad [6.40]$$

El resultado es el siguiente sistema de ecuaciones:

$$r_1 = -R_{DBT} = -\frac{dC_{DBT}}{dt} \quad [6.41]$$

$$r_2 = -R_{DBT} - R_{DBTO} = -\frac{dC_{DBT}}{dt} - \frac{dC_{DBTO}}{dt} \quad [6.42]$$

$$r_3 = -R_{DBT} - R_{DBTO} - R_{DBTO_2} = -\frac{dC_{DBT}}{dt} - \frac{dC_{DBTO}}{dt} - \frac{dC_{DBTO_2}}{dt} \quad [6.43]$$

$$r_4 = R_{HBP} = \frac{dC_{HBP}}{dt} \quad [6.44]$$

Cada una de estas igualdades se puede expresar de manera integral según las expresiones [6.45] a [6.48]. Teniendo en cuenta que se puede considerar la siguiente condición de contorno: $t=0 \therefore C_{DBTO}^0 = C_{DBTO_2}^0 = C_{HBP}^0 = 0$, estas expresiones toman la siguiente forma:

$$\int_0^t r_1 dt = - \int_{C_{DBT}^0}^{C_{DBT}} dC_{DBT} = C_{DBT}^0 - C_{DBT}(t) \quad [6.45]$$

$$\int_0^t r_2 dt = - \int_{C_{DBT}^0}^{C_{DBT}} dC_{DBT} - \int_{C_{DBTO}^0}^{C_{DBTO}} dC_{DBTO} = C_{DBT}^0 - C_{DBT}(t) - C_{DBTO}(t) \quad [6.46]$$

$$\begin{aligned} \int_0^t r_3 dt &= - \int_{C_{DBT}^0}^{C_{DBT}} dC_{DBT} - \int_{C_{DBTO}^0}^{C_{DBTO}} dC_{DBTO} - \int_{C_{DBTO_2}^0}^{C_{DBTO_2}} dC_{DBTO_2} = \\ &= C_{DBT}^0 - C_{DBT}(t) - C_{DBTO}(t) - C_{DBTO_2}(t) \end{aligned} \quad [6.47]$$

$$\int_0^t r_4 dt = \int_{C_{HBP}^0}^{C_{HBP}} dC_{HBP} = C_{HBP}(t) \quad [6.48]$$

Mediante estas ecuaciones, se puede obtener, a partir de los datos experimentales, el valor de $\int_0^t r_i dt$ para cada tiempo experimental y cada reacción. Siendo posible, por lo tanto, obtener los valores de r_i según la ecuación [6.36], mostrada previamente. De este modo, se simplifica el problema múltiple respuesta de partida (ecuaciones [6.28] a [6.32]) a un problema en simple respuesta que permite estudiar las reacciones individualmente. Así, de acuerdo con lo anteriormente expuesto, se pueden calcular los parámetros cinéticos del sistema mediante la aplicación de una regresión simple respuesta, reacción a reacción (García-Ochoa y col., 1990) y calcular las velocidades de reacción a cada tiempo en función de valores experimentales.

Por otro lado, la concentración del compuesto de la ruta 4S que no se está considerando como compuesto clave, HBPS, se ha calculado según la estequiometría, a partir de cuatro componentes clave, DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP, según la mencionada ecuación [6.33].

De esta manera, se procede tanto a la comprobación de la bondad de las ecuaciones cinéticas planteadas como a la determinación de valores iniciales de los parámetros cinéticos presentes en las mismas a partir de los datos de experimentos de desulfuración llevados a cabo con biocatalizadores simples de 5 y 23 h de edad celular. Para cada edad celular, se realiza el ajuste no lineal en simple respuesta, trabajando por separado con cada una de las cuatro reacciones de la ruta 4S, sobre los datos experimentales generados en ensayos de desulfuración en *resting cells*.

Para cada una de las reacciones de la ruta 4S, se va a comparar la bondad de los ajustes que se obtienen cuando el modelo propuesto contempla o no la desactivación de la enzima que cataliza cada reacción, permitiendo la estimación del valor del correspondiente parámetro S_i , o fijando su valor en cero, respectivamente. Los valores de los parámetros de afinidad e inhibición, K_i y K_I se han fijado para cada una de las reacciones en valores obtenidos previamente por el grupo FQPIMA (Alcón y col., 2008): $K_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$, $K_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$, $K_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$, $K_4 = 9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ y $K_I = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$.

6.3.1.1 Células de 5 h de tiempo de crecimiento.

A continuación se presentan los resultados de los ajustes realizados con los datos obtenidos en la desulfuración de DBT en condiciones de reposo celular con células de 5 h de edad para cada una de las reacciones de la ruta 4S, tanto no considerando la desactivación de la enzima DszC (fijando el valor de S_1 en cero), como considerando esta desactivación. Para cada una de las reacciones de la ruta 4S se han empleado los valores experimentales de evolución de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP frente al tiempo para obtener valores de velocidad de cada reacción para cada uno de los tiempos de muestreo, y realizar así el ajuste según las ecuaciones del modelo cinético que se muestran en las ecuaciones [6.18] a [6.21] citadas previamente.

- **PRIMERA REACCIÓN: oxidación de DBT**

Para la primera reacción de la ruta 4S, se muestran, en las Tablas 6.14 y 6.15, los valores de los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos en la aplicación del modelo, tanto omitiendo como teniendo en cuenta la desactivación de la enzima DszC. Según las mencionadas tablas, en ambos casos se obtienen resultados significativos con una confianza del 95 %, a la vista de los valores calculados para los parámetros F de *Fischer* y t de *Student*, mayores que los tabulados. Como era de esperar debido a la presencia de un parámetro más en el modelo empleado, la suma total de residuos al cuadrado que se obtiene a través de la regresión es menor al considerar desactivación de la enzima (1,784), que al omitir la posible desactivación de DszC, esto es, si se fija el valor del parámetro S_1 en cero (7,506).

TABLA 6.14 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la primera reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszC ($S_1=0 \text{ min}^{-1}$, $K'_1=0,153 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético					t_s		F_F		SRC
					Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k' ₁	4,74·10 ⁻²	±	0,50·10 ⁻²	(min ⁻¹)	18,854	2,003	1119,097	1,558	7,506

TABLA 6.15 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la primera reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, considerando desactivación de la enzima DszC ($K'_i=0,153 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético	t_s			F_F		SRC
	Calc.	Tab.		Calc.	Tab.	
k'_1	$7,59 \cdot 10^{-2} \pm 0,70 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	21,883	2,004	2184,388	1,564
S_1	$1,84 \cdot 10^{-2} \pm 0,33 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	10,973	2,004	1,784	

En la Figura 6.3 se muestra la comparación de los datos experimentales de concentración de DBT a lo largo del tiempo de ensayo, con los valores que predice el modelo cinético propuesto para las seis concentraciones de biomasa empleadas en la experimentación llevada a cabo. En todos los casos, se observa que, de acuerdo con lo comentado anteriormente, las predicciones del modelo se aproximan más a los valores experimentales en los casos en que se tiene en cuenta la pérdida de actividad de la enzima DszC. Las predicciones obtenidas mediante este modelo cinético en los casos en que no se considera la pérdida de actividad enzimática con concentraciones de biomasa de 2,1 y 2,8 g peso seco/L, son aceptables. Sin embargo los valores generados al emplear el resto de las concentraciones de biomasa probadas, se alejan más de los valores experimentales.

En la Figura 6.4 se representa cada uno de los valores de concentración de DBT generados por el modelo cinético, según se consideró o no la desactivación de la enzima DszC, frente a los correspondientes valores experimentales. Se muestran también, como referencia en la misma figura, las líneas que limitarían las predicciones con errores máximos del 10 y 20 % respectivamente, y la bisectriz que representaría predicciones sin error de los valores experimentales. Los valores generados mediante las dos variaciones del modelo cinético dan lugar a errores por exceso y por defecto distribuidos alrededor de la bisectriz. En el caso de no tener en cuenta la pérdida de actividad de la enzima DszC, los errores de predicción son mayores que en el caso de considerar dicha desactivación, de acuerdo con lo comentado en el párrafo anterior. Al tener en cuenta en el modelo cinético la desactivación de DszC, se obtiene una distribución de puntos teóricos frente a experimentales más homogénea con respecto de la bisectriz, y con errores inferiores al 20%, salvo en dos casos puntuales.

En el caso de la primera reacción de la ruta 4S, la consideración de la desactivación de la enzima DszC en el modelo cinético permite mejores predicciones de los valores experimentales, y con un error más homogéneamente distribuido.

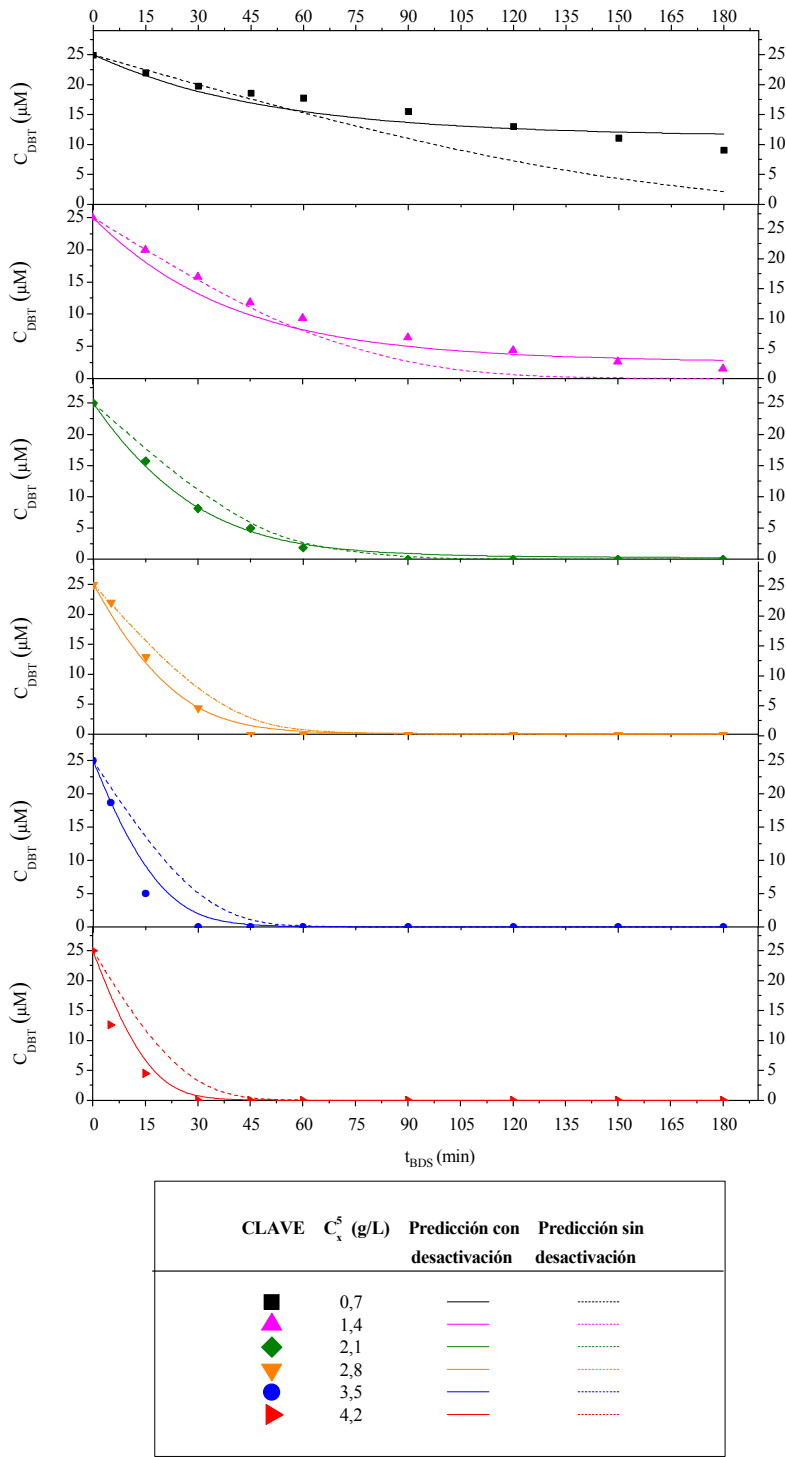


FIGURA 6.3 – Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT frente al tiempo con células de 5h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszC.

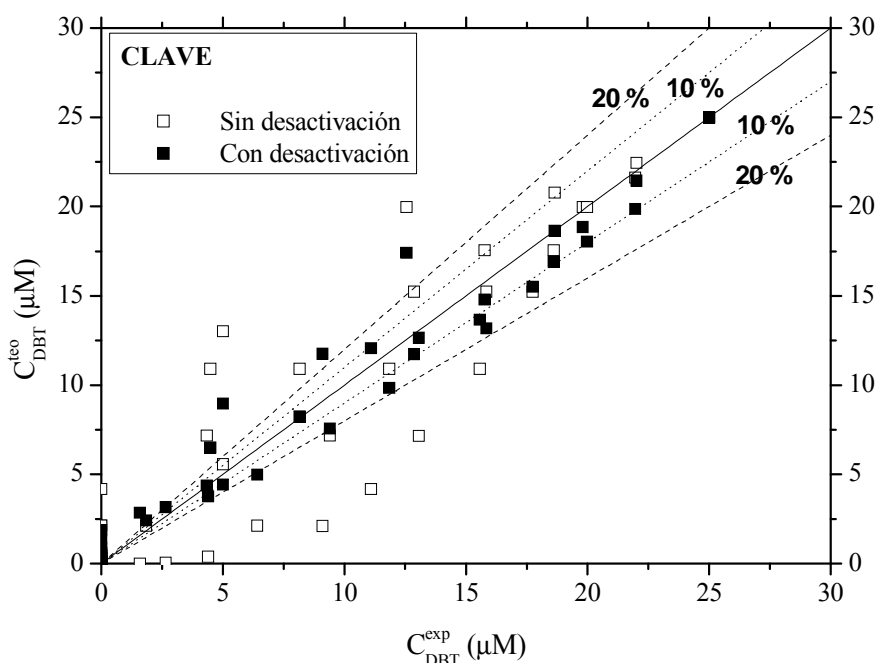


FIGURA 6.4 – Representación de los valores de DBT generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszC empleando el método de velocidades de reacción.

• **SEGUNDA REACCIÓN: oxidación de DBTO**

Los datos experimentales se han empleado para obtener los parámetros de ajuste concernientes a la velocidad de reacción de la segunda etapa de la ruta 4S. En las Tablas 6.16 y 6.17 se recogen los parámetros cinéticos y estadísticos que se obtienen al emplear el modelo cinético propuesto, según se omita o se considere la desactivación de la enzima DszC. Los valores de los parámetros estadísticos son mejores que en el caso de tener en cuenta la pérdida de actividad de la enzima en esta segunda reacción de la ruta 4S. Tanto los valores calculados de *t de Student*, como los de *F de Fisher* son mayores que los tabulados, demostrando que se obtienen resultados en los ajustes con significancia estadística para una confianza del 95%. De manera análoga a la aplicación del método sobre la primera reacción de la ruta, se obtiene una suma de residuos al cuadrado claramente menor (0,368), al considerar la pérdida de actividad en la enzima DszC, que, como se ha comentado, también cataliza la segunda etapa de la ruta 4S.

De acuerdo con lo anterior, en la Figura 6.5 se muestra la evolución a lo largo del tiempo de ensayo de los valores de concentración de DBTO experimentales y los generados por el modelo cinético, cuando se considera la desactivación de la enzima y cuando ésta no se tiene en cuenta.

Al comparar la capacidad que tiene el modelo cinético para reproducir los datos experimentales en estas dos situaciones, se observan diferencias claras. Si en el modelo no se considera la desactivación de la proteína DszC, la predicción de la concentración de DBTO que se obtiene es deficiente, sobre todo en los casos en que la concentración de biomasa es de 0,7, 1,4, 3,5 y 4,2 g peso seco/L, de forma que se reproducen mejor los datos experimentales en que se emplean valores centrales del intervalo de concentración de biomasa propuesto (2,1 y 2,8 g peso seco/L). En los casos en que se emplean concentraciones bajas (0,7 y 1,4 g peso seco/L) el modelo predice valores por exceso, y en los casos de mayor concentración de biomasa (3,5 y 4,2 g peso seco/L), la predicción se obtiene por defecto, con respecto a los datos experimentales. Se logra, por tanto, una mejor coincidencia entre los datos experimentales y los calculados al considerar en el modelo cinético la desactivación en la enzima DszC.

En la Figura 6.6 se representan los valores teóricos de concentración de DBTO generados por el modelo cinético, frente a los correspondientes valores experimentales, según se tenga en cuenta o no la desactivación de la enzima DszC. En ambos casos, se obtienen errores en la predicción mayores que los que se reflejan en la Figura 6.4 para la primera reacción de la ruta 4S. En este caso, el compuesto intermedio DBTO es más difícil de predecir, sobre todo, y a la vista de los resultados reflejados en la anterior Figura 6.5, en lo que se refiere a los valores más próximos a cero. Aún así, se pone de manifiesto una mejor predicción al considerar en el modelo cinético la pérdida de actividad de la enzima. Al incluir en el modelo cinético un término de desactivación de DszC, se logran errores más uniformemente distribuidos y menores en términos absolutos. La omisión de este término en el modelo da lugar a mayores errores en la predicción de los máximos de concentración de este compuesto intermedio, generalmente por defecto, como se manifiesta en la Figura 6.5, comentada previamente. Así también, las peores predicciones a menores concentraciones de biomasa, cuando no se considera la desactivación de DszC, dan lugar a importantes discrepancias entre los valores experimentales y los teóricos.

TABLA 6.16 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la segunda reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszC ($S_2=0 \text{ min}^{-1}$, $K'_2=0,266 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_2	0,209	\pm	0,014 (min^{-1})	30,747	2,003	19,989	1,552	1,560

TABLA 6.17 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la segunda reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, considerando desactivación de la enzima DszC ($K'_2=0,266 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_2	0,146	\pm	0,009 (min^{-1})	32,350	2,003	32,425	1,558	0,368
S_2	$1,61 \cdot 10^{-2}$	\pm	$0,18 \cdot 10^{-2}$ (min^{-1})	17,712	2,003			

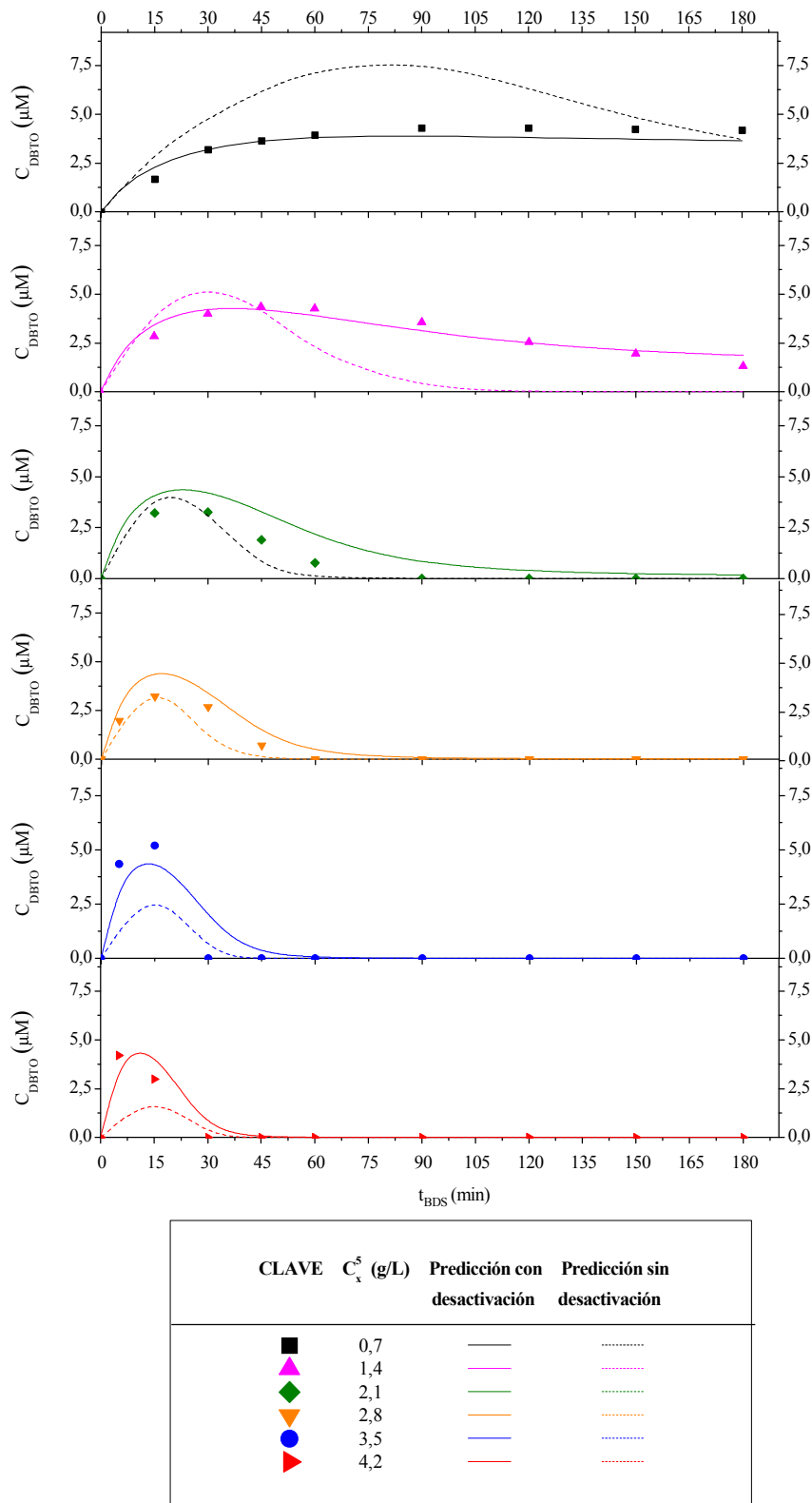


FIGURA 6.5 – Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBTO frente al tiempo con células de 5h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszC.

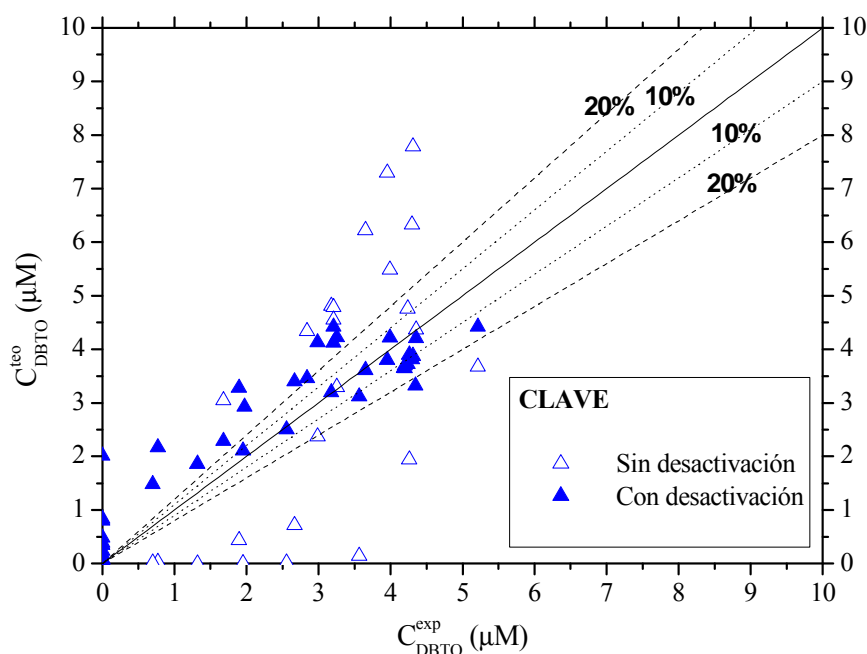


FIGURA 6.6 - Representación de los valores de DBTO generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszC empleando el método de velocidades de reacción

- **TERCERA REACCIÓN: oxidación de DBTO₂**

De manera análoga al caso de las dos primeras reacciones de la ruta 4S, se muestra en las Tablas 6.18 y 6.19 los valores de los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos al emplear regresión no lineal para el modelo cinético propuesto, al no considerar la pérdida de actividad de la enzima DszA y al tener en cuenta esta desactivación, respectivamente. Así, se obtienen resultados estadísticamente significativos para una confianza del 95%, a la vista de valores calculados de *F de Fisher* y *t de Student*, mayores que los valores tabulados para los correspondientes grados de libertad. La incorporación en el modelo de un parámetro que describe la desactivación de la enzima DszA, permite reducir el error en la predicción de los valores experimentales, como se refleja en la menor suma de residuos obtenida (5,621).

En la Figura 6.7 se representan los datos experimentales de evolución de la concentración de DBTO₂ a lo largo del tiempo de ensayo con diferentes concentraciones de biomasa, y las predicciones según se consideren estas dos alternativas en el modelo cinético propuesto.

Los resultados obtenidos en ambos casos no presentan grandes diferencias al comparar las evoluciones que se muestran en la citada figura. La predicción que genera el modelo cuando se tienen en cuenta la desactivación enzimática es algo mejor, sobre todo al comparar la coincidencia entre los valores experimentales y calculados en los casos de mayor concentración de biomasa (2,8; 3,5 y 4,2 g peso seco/L).

En la Figura 6.8 se muestra la representación de las predicciones de concentración de DBTO₂ que se obtienen al emplear las dos variaciones consideradas para el modelo cinético, frente a los correspondientes valores experimentales. Se observa un menor error en la predicción de los valores experimentales, generalmente, al considerar la desactivación de la enzima DszA en el modelo cinético. La mayor parte de los pares de puntos se encuentran en la zona delimitada con un error máximo del 20 %. Para los valores en que se supera este error de predicción, la consideración de la pérdida de actividad de esta enzima permite diferencias entre los valores experimentales y teóricos sustancialmente menores que al no considerar dicha desactivación.

TABLA 6.18 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la tercera reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszA ($S_3=0 \text{ min}^{-1}$, $K'_3=0,109 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético	t_s		F_F		SRC
	Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_3 $1,65 \cdot 10^{-2} \pm 0,12 \cdot 10^{-2} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	27,256	2,003	311,405	1,558	8,644

TABLA 6.19 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la tercera reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, considerando desactivación de la enzima DszA ($K'_3=0,109 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético	t_s		F_F		SRC
	Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_3 $2,14 \cdot 10^{-2} \pm 0,39 \cdot 10^{-2} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	11,127	2,004	155,312	1,564	5,621
S_3 $0,38 \cdot 10^{-2} \pm 0,24 \cdot 10^{-2} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	3,067	2,004			

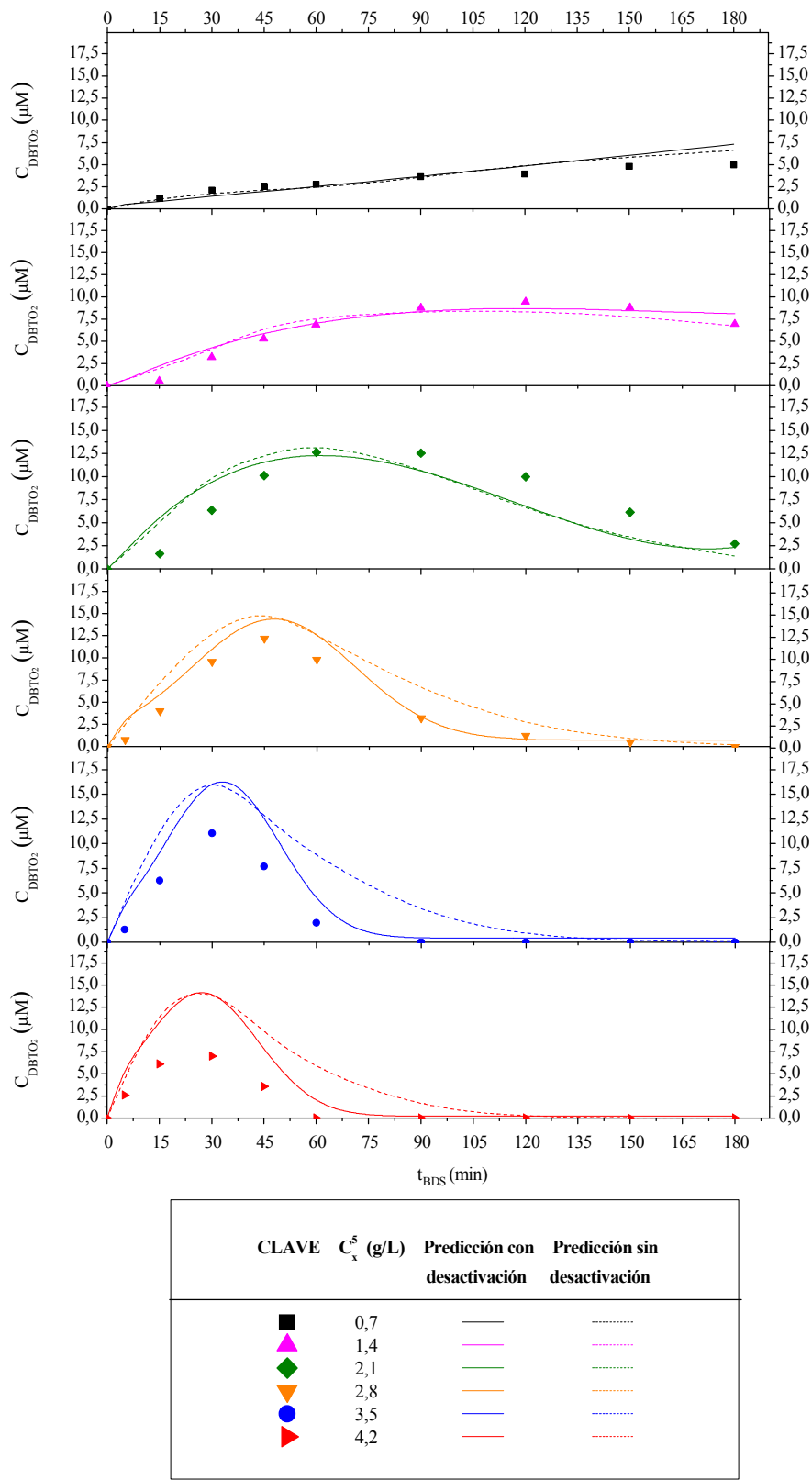


FIGURA 6.7 – Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBTO₂ frente al tiempo con células de 5h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszA.

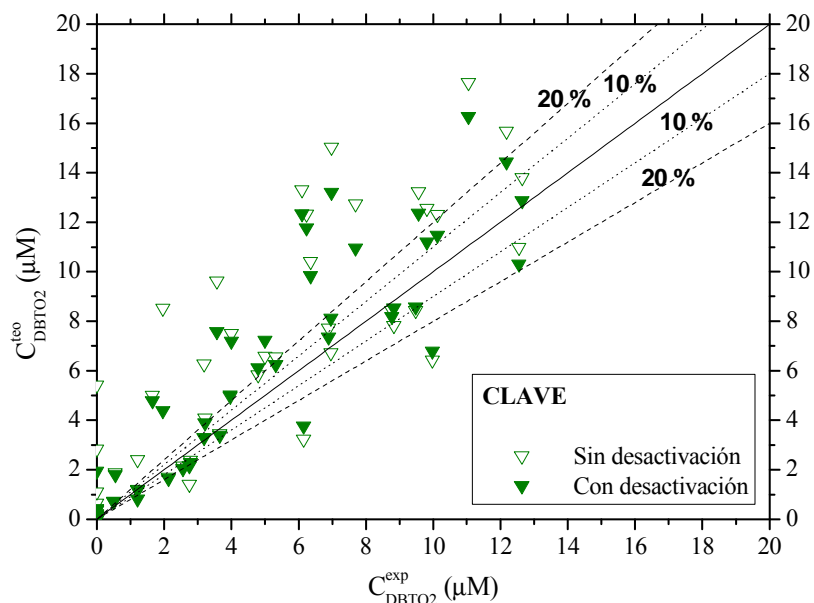


FIGURA 6.8 - Representación de los valores de DBTO₂ generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszA empleando el método de velocidades de reacción.

- **CUARTA REACCIÓN: eliminación del átomo de azufre de HBPS**

Para la última reacción de la ruta 4S, se recogen en las Tablas 6.20 y 6.21 los valores de los parámetros cinéticos y estadísticos que se obtienen en los ajustes sobre los datos experimentales, al omitir en el modelo cinético la pérdida de actividad de la enzima DszB y al considerar dicha desactivación. De igual manera que en los casos anteriores, la aplicación del método de velocidades de reacción en esta etapa de la ruta 4S da lugar a resultados significativos, a la vista de los valores calculados para *F de Fisher* y *t de Student*, mayores que los tabulados. En las mencionadas Tablas 6.20 y 6.21 se observa que, dada la menor suma de residuos al cuadrado obtenida, se generan menores errores en la predicción al considerar la desactivación de la enzima DszB con el tiempo. Si bien, las diferencias obtenidas entre ambas situaciones son pequeñas, claramente por debajo del error experimental.

En las Figura 6.9 se muestra la evolución de los datos experimentales de concentración de HBP y las predicciones que se obtienen al emplear el modelo propuesto según se considere o no la desactivación de la proteína DszB. En ambos casos. Las predicciones son muy parecidas. Particularmente, los datos generados para los menores valores de biomasa (0,7 y 1,4 g peso seco/L) se desvían más con respecto a los datos experimentales en los casos en que no se considera la desactivación de la enzima DszA.

La Figura 6.10 representa los pares de valores experimentales y teóricos, comparando la diferente predicción que genera el modelo cinético al omitir y considerar, respectivamente, la desactivación de la enzima DszB en la cuarta reacción de la ruta 4S. Se muestran las mayores discrepancias entre los datos generados en la regresión y los experimentales al no tener en cuenta la pérdida de actividad de dicha enzima con el tiempo. Así, la consideración de la pérdida de actividad de la desulfinasas DszB permite al aplicar este modelo, un menor error de predicción y la reducción de las tendencias que tienen estos valores respecto al caso de no tener en cuenta esta desactivación, como se muestra en la Figura 6.10.

TABLA 6.20 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la primera reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszB ($S_4=0 \text{ min}^{-1}$, $K'_4=9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, $K'_5=0,127 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético					t_s		F_F		SRC
					Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_4	$2,50 \cdot 10^{-2}$	\pm	$0,50 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	6,830	2,003	14131,25	1,558	0,810

TABLA 6.21 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la primera reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, considerando desactivación de la enzima DszB ($K'_4=9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, $K'_5=0,127 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético					t_s		F_F		SRC
					Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_4	0,469	\pm	0,208	(min^{-1})	4,516	2,005	15799,9	1,571	0,401
S_4	$1,52 \cdot 10^{-2}$	\pm	$0,40 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	7,701	2,005			

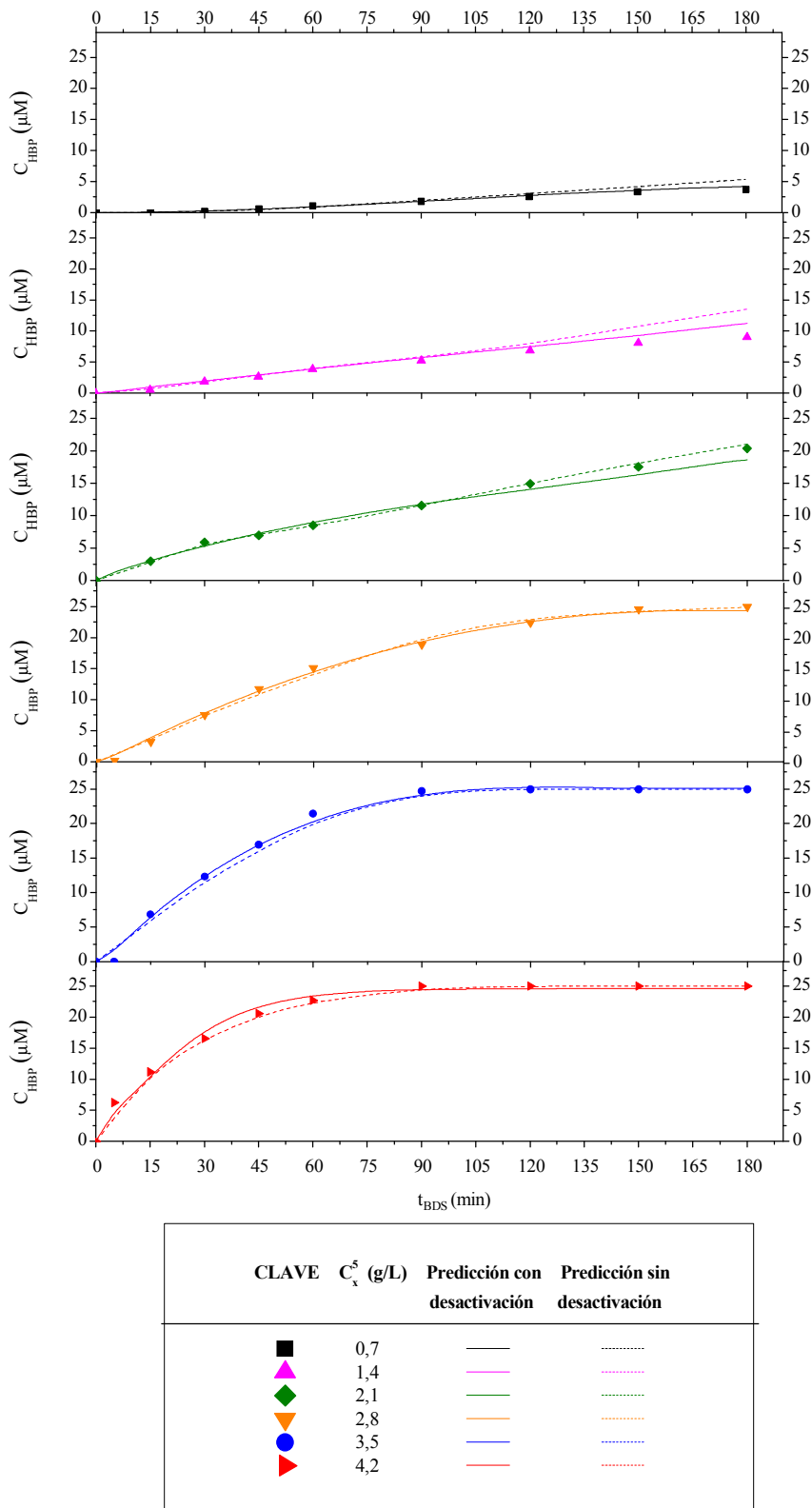


FIGURA 6.9 – Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de HBP frente al tiempo con células de 5h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszB.

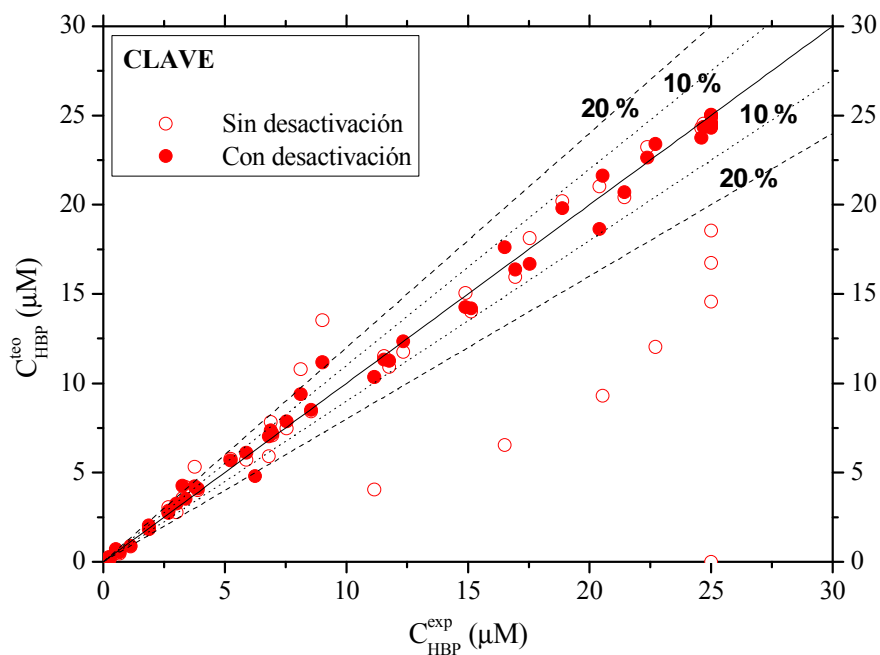


FIGURA 6.10 - Representación de los valores de HBP generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszB empleando el método de velocidades de reacción.

6.3.1.2 Células de 23 h de tiempo de crecimiento.

En este apartado se aplica el método de velocidades de reacción a los resultados experimentales obtenidos al desulfurar DBT en condiciones de *resting cells* con células de 23 h de edad de *Pseudomonas putida* CECT5279. Se procede de igual manera que en el apartado anterior y se llevan a cabo los ajustes realizados sobre los datos obtenidos en la desulfuración de DBT en condiciones de reposo celular con células de este tiempo crecimiento.

Así, se han podido obtener valores de velocidad de cada reacción para cada uno de los tiempos de muestreo y, de esta manera, se ha realizado el ajuste según las ecuaciones del modelo cinético ([6.18] a [6.21]).

- **PRIMERA REACCIÓN: oxidación de DBT**

En las Tablas 6.22 y 6.23 se muestran los parámetros cinéticos y estadísticos derivados de los ajustes sobre los datos relativos a la primera reacción de la ruta 4S, omitiendo y considerando, respectivamente, en el modelo cinético la desactivación de la enzima DszC, que cataliza esta etapa de la ruta metabólica. Los valores de *F de Fisher* y *t de student* calculados son mayores que los tabulados, mostrando la significancia estadística de los resultados obtenidos en los ajustes mediante el empleo de las dos variaciones propuestas para el modelo. Desde el punto de vista de la suma de residuos al cuadrado obtenida en las predicciones que genera el modelo, la consideración de la desactivación de la enzima DszC permite un error de predicción ligeramente menor a que se obtiene al no tener en cuenta dicha desactivación.

La evolución de la concentración de DBT a lo largo del tiempo de ensayo obtenida experimentalmente y las predicciones que se generan al emplear el modelo cinético propuesto, según se considere o no la desactivación de la enzima DszC, para las seis concentraciones de biomasa propuestas se muestran en la Figura 6.11. La predicción de los datos experimentales es bastante buena en ambos casos. Los datos calculados son ligeramente más cercanos a los experimentales al considerar la desactivación de la enzima.

En la Figura 6.12 se representan los valores calculados por el modelo, en ambas situaciones, frente a los valores experimentales. Como se ha comentado previamente, y de acuerdo con los valores de la suma de residuos al cuadrado, las predicciones de la evolución de DBT es bastante buena tanto al considerar, como al obviar la desactivación de la enzima DszC. Si bien, las predicciones realizadas al considerar esta desactivación enzimática se acercan más a los valores reales.

A esta edad, 23 h, el efecto de la desactivación de la enzima DszC es menos intenso que en caso de emplear células de 5 h de edad. Así se refleja al comparar los valores del parámetro de desactivación *S_I* para 5 y 23 h de edad, respectivamente, $1,84 \cdot 10^{-2}$ y $0,53 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

TABLA 6.22 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la primera reacción de la ruta 4S con células de 23h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszC ($S_1 = 0 \text{ min}^{-1}$, $K'_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético					t_s		F_F		SRC
					Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_1	$9,08 \cdot 10^{-2}$	\pm	$0,45 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	40,413	2,002	6236,811	1,546	1,106

TABLA 6.23 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la primera reacción de la ruta 4S con células de 23h de edad, considerando desactivación de la enzima DszC ($K'_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético					t_s		F_F		SRC
					Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_1	$9,94 \cdot 10^{-2}$	\pm	$0,69 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	28,679	2,002	7207,940	1,552	0,943
S_1	$0,53 \cdot 10^{-2}$	\pm	$0,31 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	3,487	2,002			

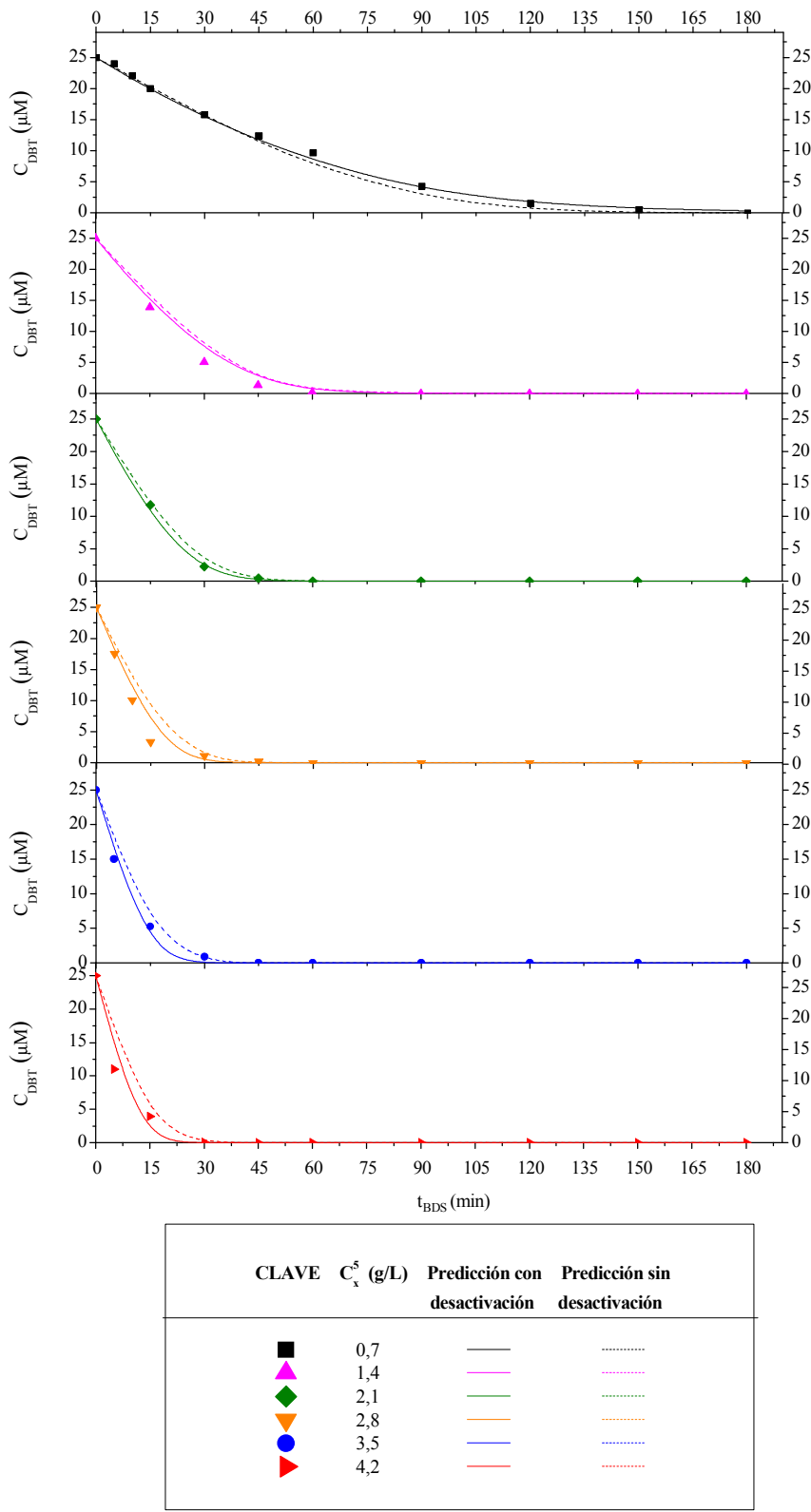


FIGURA 6.11 – Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT frente al tiempo con células de 23h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszC.

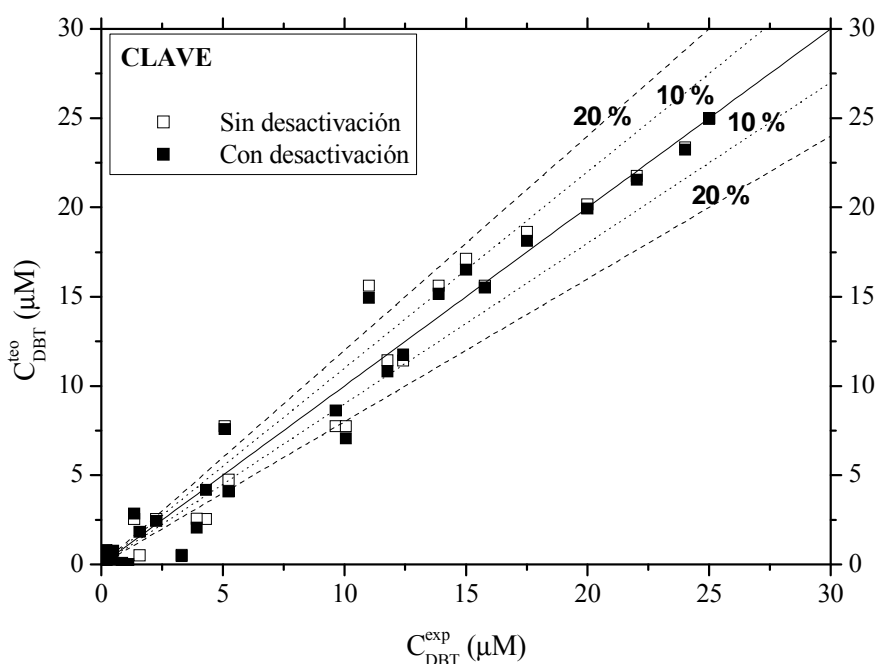


FIGURA 6.12 - Representación de los valores de DBT generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszC empleando el método de velocidades de reacción.

• SEGUNDA REACCIÓN: oxidación de DBTO

En lo que se refiere a la segunda reacción de la ruta 4S, los resultados obtenidos al emplear el método de velocidades de reacción sobre los datos experimentales con células de 23 h de tiempo de crecimiento se muestran en las Tablas 6.24 y 6.25. En ellas se presentan los parámetros cinéticos calculados y los parámetros estadísticos generados en los ajustes no lineales de simple respuesta, a emplear el modelo cinético propuesto, según se considere o no la desactivación de la enzima DszC. En ambos casos de predicen adecuadamente los datos experimentales, con resultados estadísticamente significativos a la vista de los mayores valores calculados de *F de Fisher* y de *t de Student* sobre los tabulados para un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, se ha obtenido la suma total de residuos al cuadrado es mayor (1,010), en el caso de no considerar desactivación, que al tener en cuenta la pérdida de actividad de la enzima DszC (0,263).

La Figura 6.13 muestra la evolución de los datos experimentales de DBT y los que predice el modelo cinético en estas dos situaciones: sin considerar la desactivación de la enzima DszC, y teniendo en cuenta en el modelo la pérdida de actividad de la enzima. Las predicciones que se obtienen mediante el modelo cinético propuesto son parecidas. Si bien, la desviación de los datos experimentales es menor al considerar la desactivación de la proteína DszC, en los casos en que se emplea la menor y las mayores concentraciones de biomasa (0,7, 3,5 y 4,2 g peso seco/L). En particular, en el caso de utilizar una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L se predicen valores muy por defecto, al no considerar la desactivación de la enzima DszC en el modelo cinético.

En la Figura 6.14 se representan los valores generados de DBTO por el modelo cinético en los dos casos ya mencionados frente a los respectivos valores experimentales. En el caso de considerar la desactivación de DszC se obtiene una mayor concordancia entre los valores calculados y los obtenidos experimentalmente.

De manera análoga a los resultados obtenidos en el estudio de la primera etapa de la ruta 4S, y de forma coherente con los resultados obtenidos con células de 5 h de edad, la pérdida de actividad enzimática de la proteína DszC a lo largo del tiempo debe considerarse en el modelo cinético.

TABLA 6.24 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la segunda reacción de la ruta 4S con células de 23 h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszC ($S_2 = 0 \text{ min}^{-1}$, $K'_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_2	0,350	\pm 0,058	(min^{-1})	12,227	2,002	3,615	1,546	1,010

TABLA 6.25 - Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la segunda reacción de la ruta 4S con células de 23 h de edad, considerando desactivación de la enzima DszC ($K'_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_2	0,311	\pm 0,049	(min^{-1})	12,616	2,003	6,770	1,552	0,263
S_2	$1,26 \cdot 10^{-2}$	\pm $0,71 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	3,556	2,003			

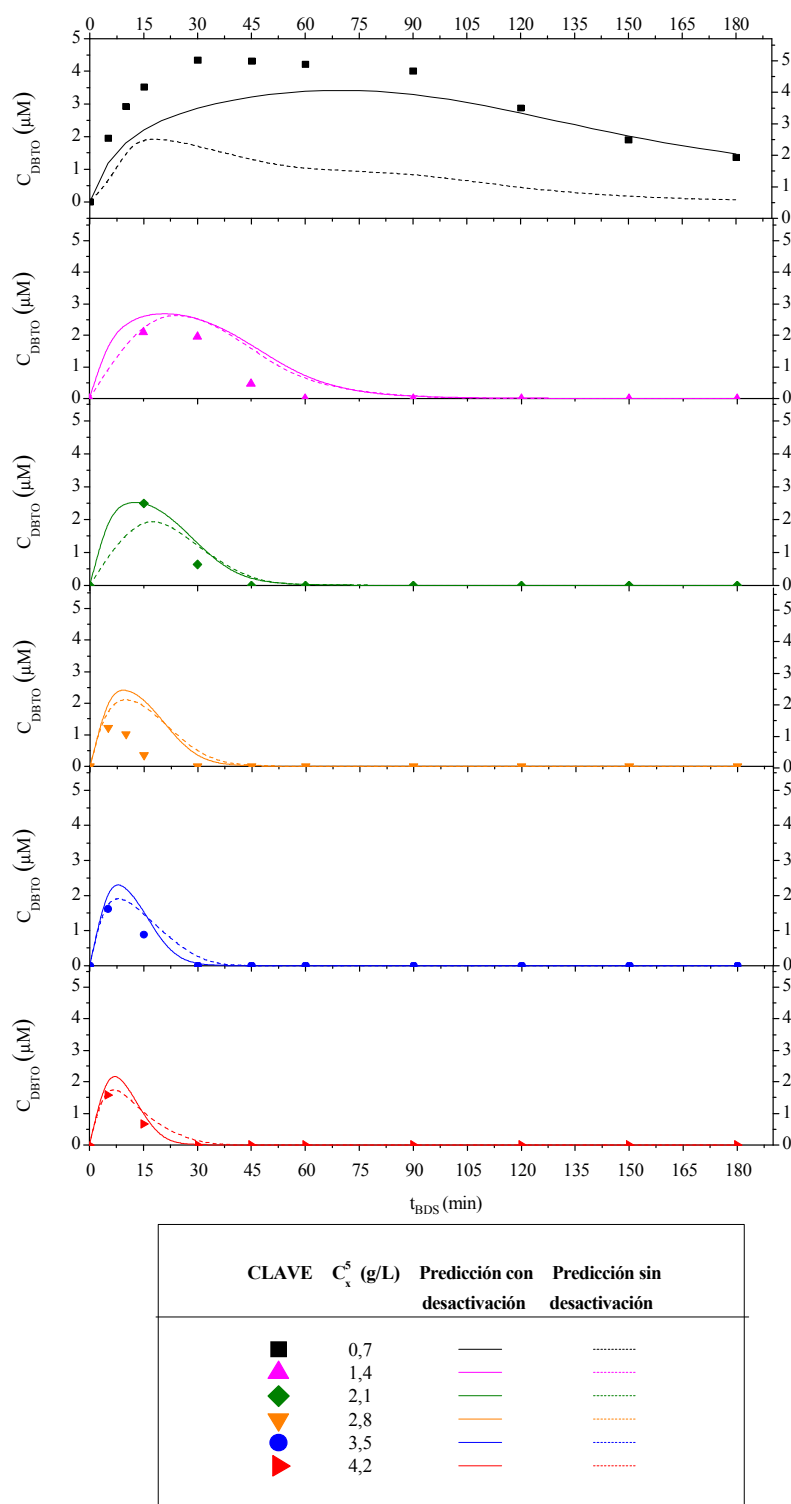


FIGURA 6.13 – Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBTO frente al tiempo con células de 23h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszC.

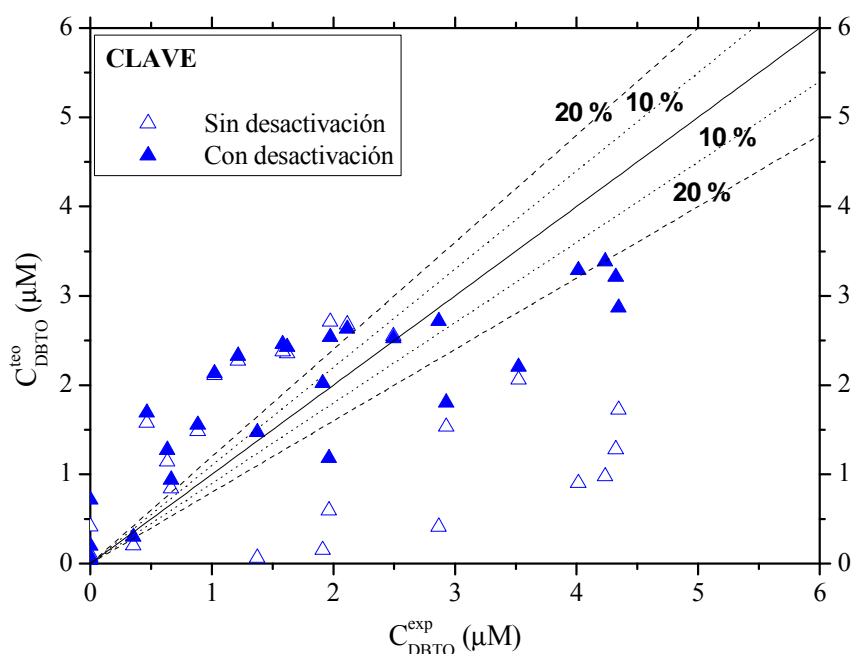


FIGURA 6.14 - Representación de los valores de DBTO generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszC empleando el método de velocidades de reacción.

- **TERCERA REACCIÓN: oxidación de DBTO₂**

En las Tablas 6.26 y 6.27 se recogen los valores de los parámetros cinéticos y estadísticos al obviar o al tener en cuenta, respectivamente, la desactivación de la enzima DszA en la velocidad de la tercera reacción. Los valores calculados de t de Student y de F de Fisher son mayores que los tabulados para los correspondientes grados de libertad en cada caso, mostrando la significancia estadística de los resultados obtenidos para una confianza del 95%. En el caso de considerar en el modelo cinético la pérdida de actividad de la enzima DszA, como se deduce de la comparación de las mencionadas Tablas 6.26 y 6.27, se logra reducir la suma de residuos al cuadrado con respecto a la omisión de esta desactivación en el modelo.

En la Figura 6.15 se muestra la evolución de la concentración de DBTO₂ a lo largo del tiempo de ensayo, junto con la predicción generada al emplear el modelo cinético, bien sin considerar, bien teniendo en cuenta, la pérdida de actividad de la enzima DszA con el tiempo. Al emplear la variación del modelo que tiene en cuenta esta desactivación se consigue una predicción claramente mejor que al describir el

sistema con un modelo que no la tiene en cuenta. Considerar la pérdida de actividad enzimática en el modelo permite predecir mejor la evolución que tiene lugar al emplear la concentración de biomasa más baja (0,7 g peso seco/L) y las más elevadas (3,5 y 4,2 g peso seco/L).

En la Figura 6.16 se representan los valores de concentración de DBTO₂ que genera cada variación del modelo cinético frente a los correspondientes valores experimentales. De acuerdo con la peor predicción de los datos experimentales del modelo al no considerar la desactivación de la enzima DszA en el modelo cinético, como se ha comentado previamente, se refleja en esta figura una mayor discrepancia entre los valores teóricos y los experimentales al no tener en cuenta dicha pérdida de actividad. Al incluir en el modelo cinético la desactivación de DszA se logra una mejor distribución del error y menores tendencias del mismo.

De la misma manera que en el caso de emplear células de 5 h de tiempo de crecimiento, para la tercera reacción de la ruta 4S, se obtienen mejores resultados al emplear un modelo que considere la pérdida de la actividad de la enzima DszA.

TABLA 6.26 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la tercera reacción de la ruta 4S con células de 23h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszA ($S_3 = 0 \text{ min}^{-1}$, $K'_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_3	0,126	\pm 0,029	(min^{-1})	8,742	2,001	3,258	1,540	6,874

TABLA 6.27 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la tercera reacción de la ruta 4S con células de 5h de edad, considerando desactivación de la enzima DszA ($K'_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_3	0,195	\pm 0,051	(min^{-1})	7,711	2,002	7,113	1,546	1,964
S_3	$2,28 \cdot 10^{-2}$	\pm $0,77 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	5,965	2,002			

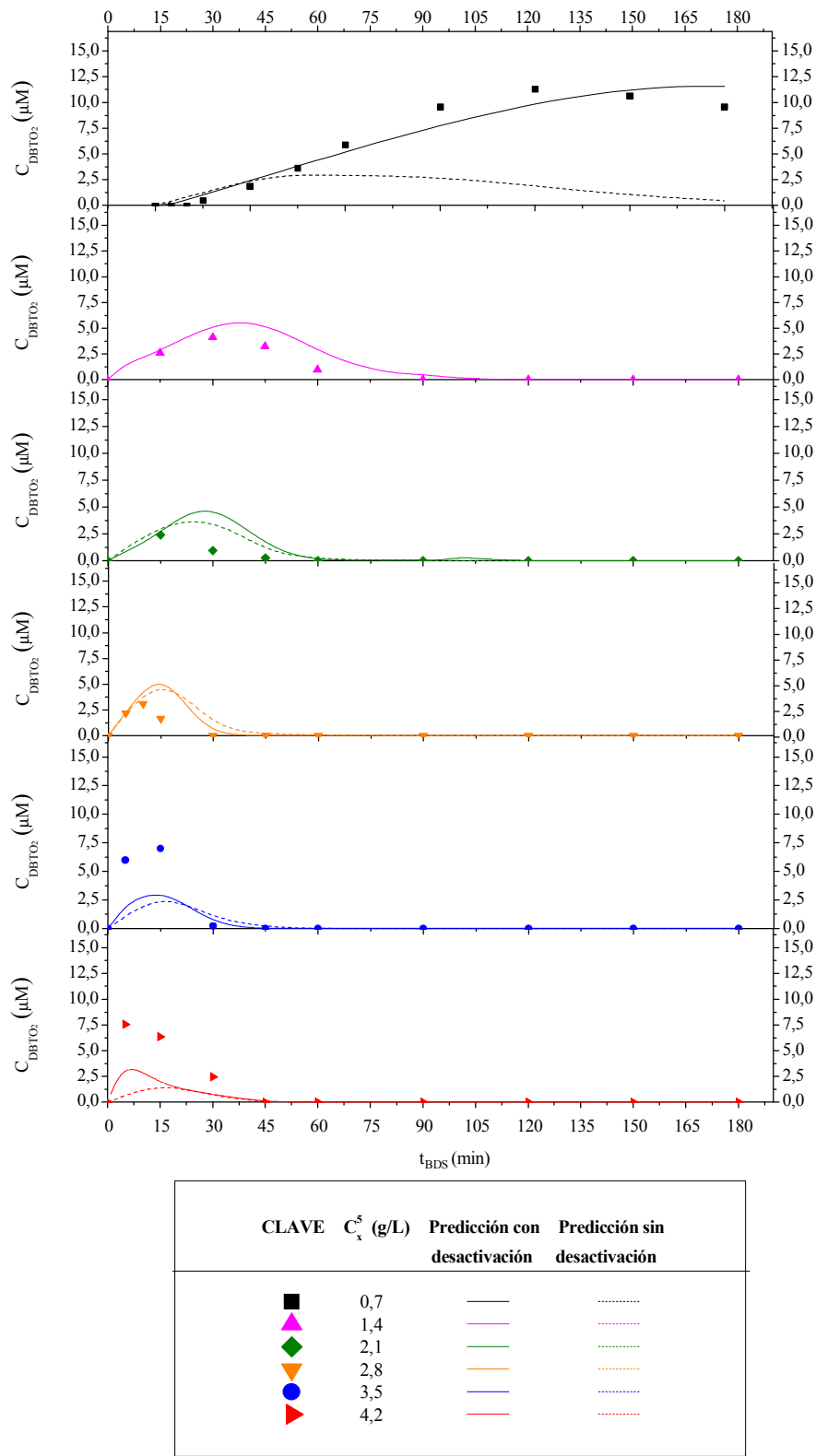


FIGURA 6.15 – Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBTO₂ frente al tiempo con células de 23h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszA.

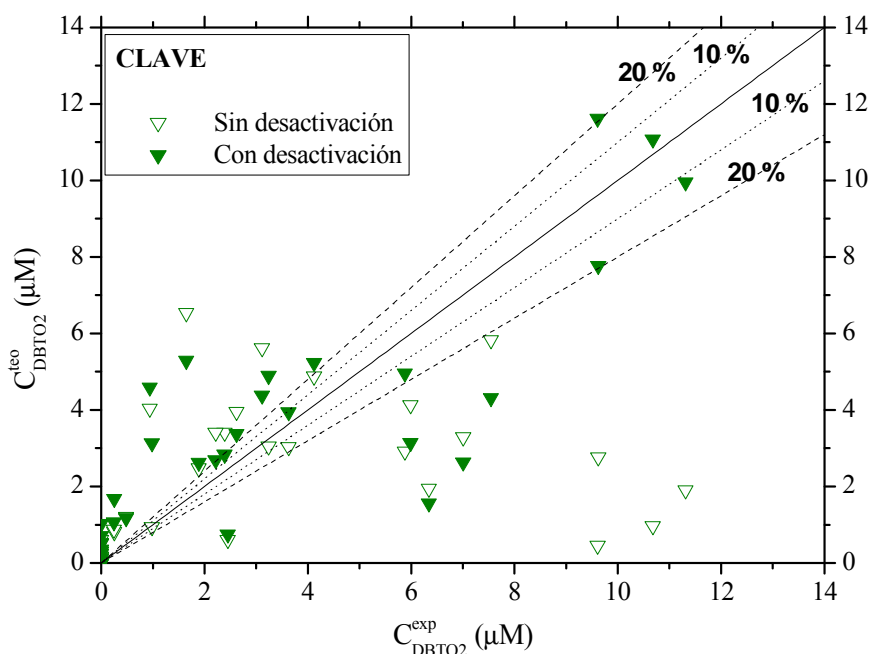


FIGURA 6.16 - Representación de los valores de DBTO₂ generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszA empleando el método de velocidades de reacción.

- **CUARTA REACCIÓN: eliminación del átomo de azufre de HBPS**

Para la cuarta reacción de la ruta 4S se recogen en las Tablas 6.28 a 6.29 los valores de los parámetros cinéticos y estadísticos que se obtienen al emplear el modelo cinético propuesto según se tenga en cuenta o no la desactivación de la enzima DszB. Como en el resto de los casos, tanto los valores calculados de *F de Fisher*, como los de *t de Student* son superiores a los tabulados, permitiendo afirmar que los resultados obtenidos son estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95%. En cuanto al error en la predicción, la consideración de la desactivación de la enzima DszB permite obtener un suma de residuos al cuadrado mucho menor que en el caso de no considerar dicha desactivación, a la vista de los valores reflejados en dichas tablas.

La Figura 6.17 muestra la evolución de los datos experimentales de concentración de HBP y las predicciones del modelo cinético según las dos posibilidades comentadas. Se puede decir que en aquellos casos en que no se ha considerado desactivación de la enzima DszB en el modelo, los ajustes de los datos son peores. En dicha Figura se observa una peor predicción de la evolución de la

concentración de HBP al emplear una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L. Esta situación mejora al emplear en la regresión el modelo cinético propuesto teniendo en cuenta la pérdida de actividad de la enzima. Para el resto de las concentraciones de biomasa empleadas, las predicciones han sido bastante satisfactorias.

En las Figura 6.18 se representan los valores de concentración de HBP que predice el modelo cinético obviando y teniendo en cuenta la pérdida de actividad de la enzima DszB. Se obtiene una mejor concordancia entre los valores experimentales y los teóricos, errores distribuidos más homogéneamente por exceso y por defecto, al emplear un modelo que considere esta desactivación.

A la vista de los resultados obtenidos al emplear el método de velocidades de reacción para cada una de las cuatro reacciones de la ruta 4S, y para las dos edades celulares consideradas, 5 y 23 h, se escoge como modelo cinético más adecuado el que considera la pérdida de actividad de cada una de las enzimas de la ruta 4S a lo largo del tiempo.

TABLA 6.28 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la cuarta reacción de la ruta 4S con células de 23h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszB ($S_4 = 0 \text{ min}^{-1}$, $K'_4 = 9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, $K'_5 = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_4	0,234	\pm 0,0869	(min^{-1})	5,400	2,001	4957,247	1,540	4,143

TABLA 6.29 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción en la cuarta reacción de la ruta 4S con células de 23h de edad, considerando desactivación de la enzima DszB ($K'_4 = 9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, $K'_5 = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_4	0,829	\pm 0,327	(min^{-1})	5,074	2,002	11192,43	1,546	0,696
S_4	$3,60 \cdot 10^{-2}$	\pm $0,69 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	10,491	2,002			

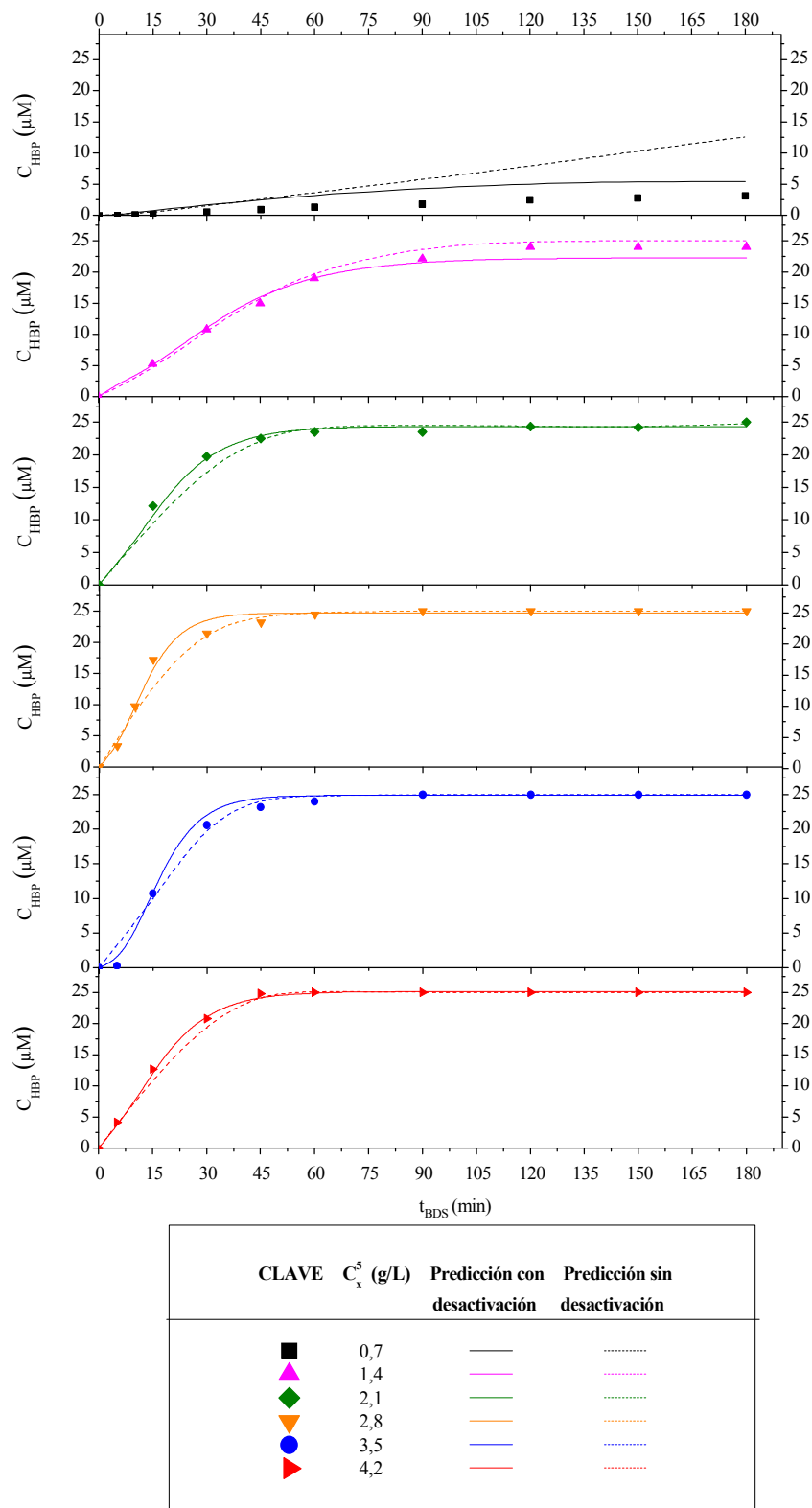


FIGURA 6.17– Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de HBP frente al tiempo con células de 23h de edad, al aplicar el método de velocidades de reacción considerando y sin considerar la desactivación de la enzima DszB.

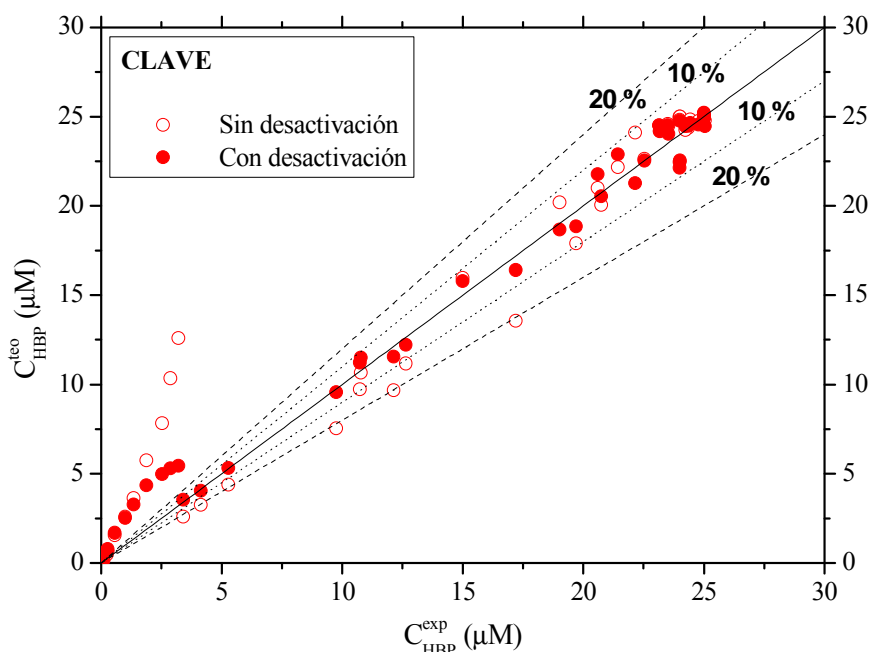


FIGURA 6.18 - Representación de los valores de HBP generados por el modelo cinético frente a los experimentales al omitir y considerar la desactivación de la enzima DszB empleando el método de velocidades de reacción.

6.3.2 MÉTODO DE VELOCIDADES DE PRODUCCIÓN

En esta segunda etapa en la formulación del modelo, se van a utilizar como valores de partida los resultados obtenidos en el cálculo de los parámetros cinéticos al emplear el método de velocidades de reacción. En este caso, se recurre a un método de regresión no lineal de múltiple respuesta en forma integral, según se describe en el Apartado 2.3 de la presente Memoria. Puesto que el estudio se ha realizado empleando datos de desulfuración en los que se parte de DBT, todas las reacciones están acopladas entre sí, el sistema es de respuesta múltiple. Por este motivo, el estudio previo mediante el método de velocidades iniciales reacción a reacción sirve como aproximación y estudio preliminar. Sin embargo, la mejor manera de estudiar este sistema es en múltiple respuesta, para calcular así los valores óptimos de los parámetros.

La ecuación [6.22] se ha aplicado sobre cada uno de los cuatro compuestos clave, y se ha obtenido un sistema compuesto por las ecuaciones cinéticas que se recogen en las expresiones [6.28] a [6.32]. Se trata de un sistema de ecuaciones

diferenciales sobre el que se aplica el método de regresión no lineal previamente mencionado. De acuerdo con la ecuación en forma integral [6.49], se pueden expresar las concentraciones de los compuestos de la ruta 4S como se muestra en las ecuaciones [6.50] a [6.54].

$$C_j - C_j^0 = \sum_{i=1}^{NC} \nu_{ij} \cdot \int_{t_0}^t r_i \cdot dt \quad [6.49]$$

$$C_{DBT} - C_{DBT}^0 = - \int_0^t \frac{k'_1 \cdot \exp(-S_1 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} dt \quad [6.50]$$

$$C_{DBTO} = \int_0^t \frac{k'_1 \cdot \exp(-S_1 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X}{1 + K'_1 \cdot C_{DBT}} dt - \int_0^t \frac{k'_2 \cdot \exp(S_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} dt \quad [6.51]$$

$$C_{DBTO_2} = \int_0^t \frac{k'_2 \cdot \exp(-S_2 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X}{1 + K'_2 \cdot C_{DBTO}} dt - \int_0^t \frac{k'_3 \cdot \exp(S_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} dt \quad [6.52]$$

$$C_{HBPS} = \int_0^t \frac{k'_3 \cdot \exp(-S_3 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X}{1 + K'_3 \cdot C_{DBTO_2}} dt - \int_0^t \frac{k'_4 \cdot \exp(S_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_4 \cdot C_{HBPS} + K'_5 \cdot C_{HBP}} dt \quad [6.53]$$

$$C_{HBP} = \int_0^t \frac{k'_4 \cdot \exp(S_4 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X}{1 + K'_4 \cdot C_{HBPS} + K'_5 \cdot C_{HBP}} dt \quad [6.54]$$

En este apartado se recogen los resultados obtenidos al emplear el método de velocidades de producción para estimar el valor de los parámetros cinéticos que forman parte del modelo que describen la evolución de los compuesto clave (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP) de la ruta 4S según el modelo propuesto en las expresiones [6.28] a [6.32].

De igual modo que en el caso del método de velocidades de reacción, se utilizan de manera separada los datos experimentales generados en ensayos de desulfuración en *resting cells* con células de cada tiempo de crecimiento (5 y 23 h). Para cada edad celular, se lleva a cabo el ajuste no lineal en múltiple respuesta de manera simultánea sobre los datos experimentales de la evolución de cada uno de los cuatro compuestos claves de la ruta metabólica.

Puesto que la convergencia de este método es más lenta que la del método de velocidades de producción, se van a utilizar los valores de los parámetros cinéticos obtenidos en el apartado anterior, mediante el método de velocidades de reacción, como valores iniciales. Estos valores se recogen en la Tabla 6.30. Se han considerado los ajustes en que se tiene en cuenta la desactivación de las tres enzimas DszC, DszA y

DszB. Puesto que el sistema que se estudia consta de una red de reacciones en serie, existe una interdependencia entre la evolución de cada uno de los compuestos de la ruta. Por este motivo, un método de regresión en múltiple respuesta es más adecuado para realizar este estudio, como se ha señalado previamente.

De la misma forma que en el caso del método de velocidades de reacción, la estequiometría del sistema permite conocer evolución del compuesto HBPS en cada momento, relacionando su concentración con la de los otros cuatro compuestos clave, DBT, DBTO, DBTO₂ y HBP, según la ecuación [6.33]. En este caso, se ha simulado la evolución del compuesto HBPS gracias a la ecuación diferencial integrada [6.53]. Asimismo, los valores K_i y K_f se han fijado para cada una de las reacciones en valores medios obtenidos previamente en la literatura por Alcón y colaboradores (Alcón y col., 2008). Siendo $K_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$, $K_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$, $K_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$, $K_4 = 9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ y $K_f = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$.

TABLA 6.30 - Recopilación de los parámetros calculados mediante el método de velocidades de reacción.

t_c (h)					
5			23		
Parámetro cinético			Parámetro cinético		
k'_1	$7,59 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,70 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)	k'_1	$9,94 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,69 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)
S_1	$1,84 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,33 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)	S_1	$0,53 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,33 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)
k'_2	0,146	$\pm 0,009$ (min ⁻¹)	k'_2	0,311	$\pm 0,049$ (min ⁻¹)
S_2	$1,61 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,18 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)	S_2	$1,26 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,71 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)
k'_3	$2,14 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,39 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)	k'_3	0,195	$\pm 0,051$ (min ⁻¹)
S_3	$0,32 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,24 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)	S_3	$2,28 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,77 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)
k'_4	0,469	$\pm 0,200$ (min ⁻¹)	k'_4	0,826	$\pm 0,327$ (min ⁻¹)
S_4	$1,52 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,40 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)	S_4	$3,60 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,69 \cdot 10^{-2}$ (min ⁻¹)

6.3.2.1 Células de 5 h de tiempo de crecimiento

A continuación se muestra el ajuste realizado para los datos experimentales obtenidos en la medida de concentración de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP a lo largo de experimentos de desulfuración en condiciones de *resting cells* para diferentes concentraciones de biomasa. En la Tabla 6.31 se recogen los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos en el ajuste de seis experimentos con células de 5 h de edad y concentraciones de biomasa de 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 y 4,2 g peso seco/L, respectivamente, según el modelo cinético propuesto.

TABLA 6.31 – Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción con células de 5 h de edad, considerando desactivación de la enzima DszB ($K'_1=0,153 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_2=0,266 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_3=0,109 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_4=9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, $K'_5=0,127 \mu\text{M}^{-1}$ y $S_4=0 \text{ min}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Tab.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'_1	$7,59 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,55 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	26,911	1,971			
S_1	$1,62 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,23 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	13,808	1,971			
k'_2	0,153	$\pm 0,023$	(min^{-1})	13,152	1,971			
S_2	$1,75 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,32 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	10,904	1,971			
k'_3	$4,07 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,31 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	25,356	1,971	1593,280	1,249	1,522
S_3	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,22 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	13,001	1,971			
k'_4	0,859	$\pm 0,046$	(min^{-1})	3,706	1,971			
S_4	$2,36 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,51 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})	9,158	1,971			

En las Figuras 6.19 a 6.24, se representan, para cada una de las seis concentraciones de biomasa empleadas (0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 y 4,2 g peso seco/L), la evolución de los datos experimentales de concentración y las predicciones para los cinco compuestos de la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS Y HBP), que se obtienen al realizar la regresión no lineal en múltiple respuesta que da lugar a los parámetros recogidos en la anterior Tabla 6.31.

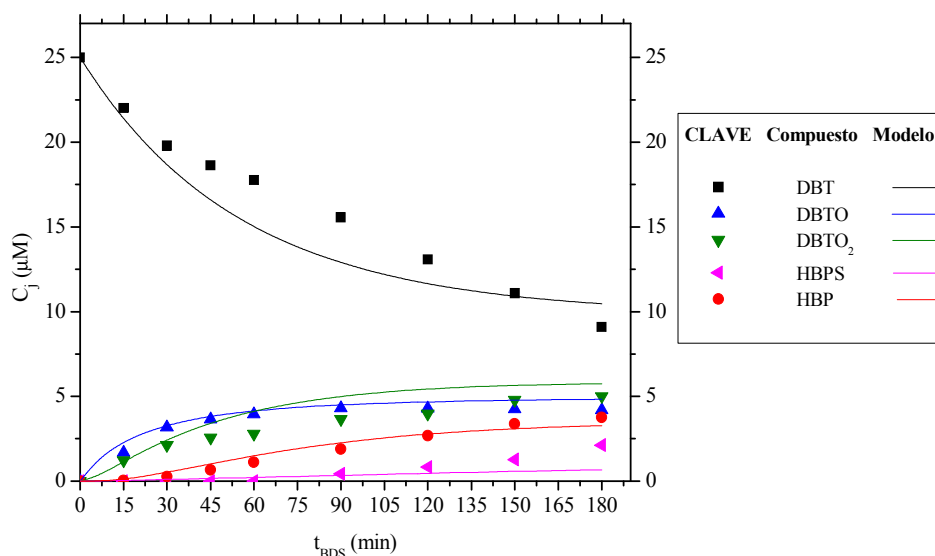


FIGURA 6.19 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 5h de edad en una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

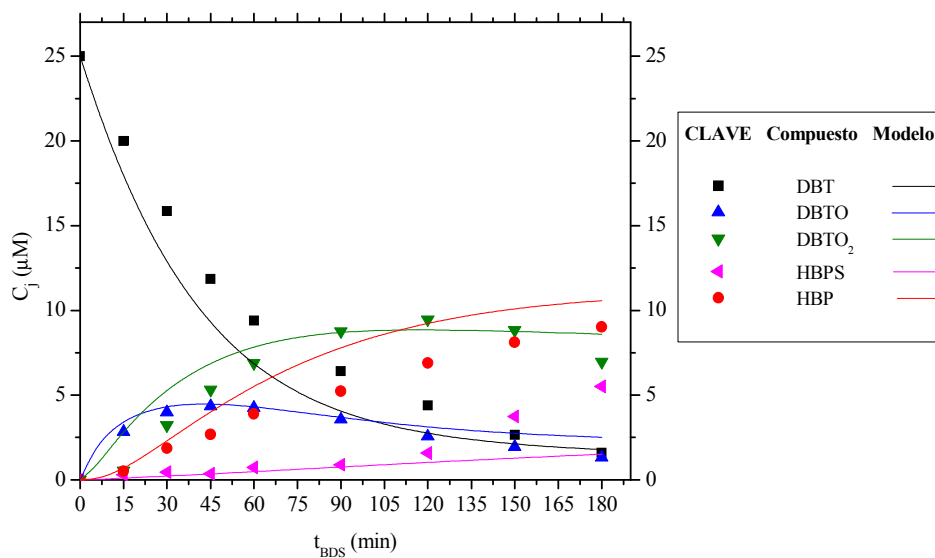


FIGURA 6.20 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 5h de edad en una concentración de biomasa de 1,4 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

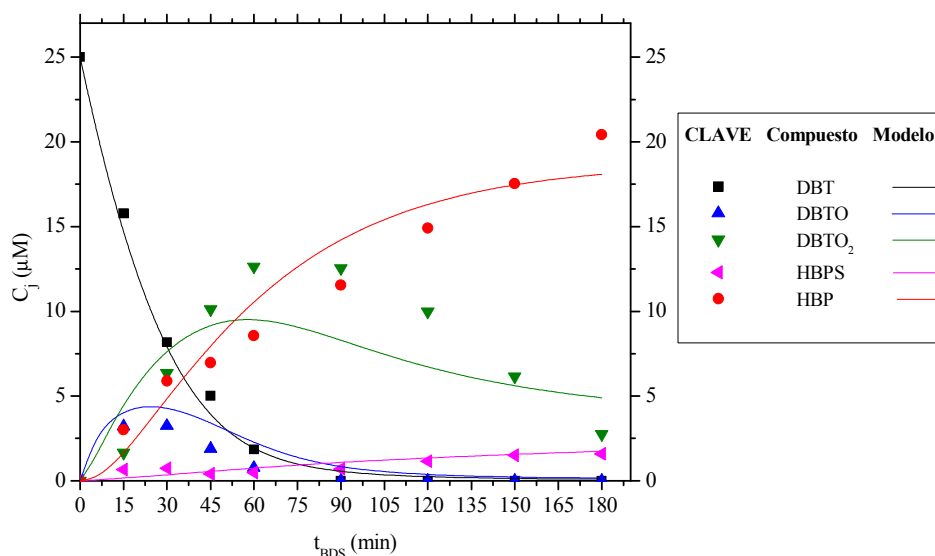


FIGURA 6.21- Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 5h de edad en una concentración de biomasa de 2,1 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

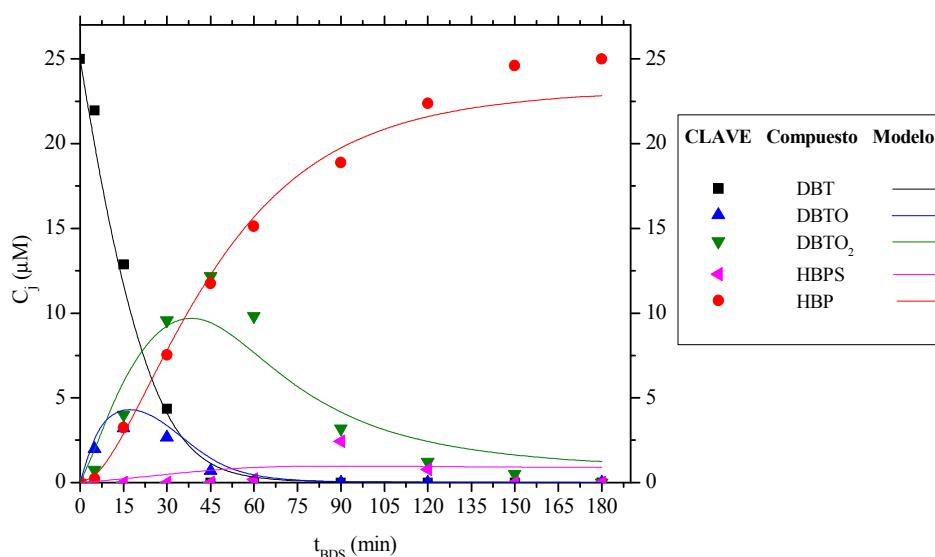


FIGURA 6.22 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 5h de edad en una concentración de biomasa de 2,8 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

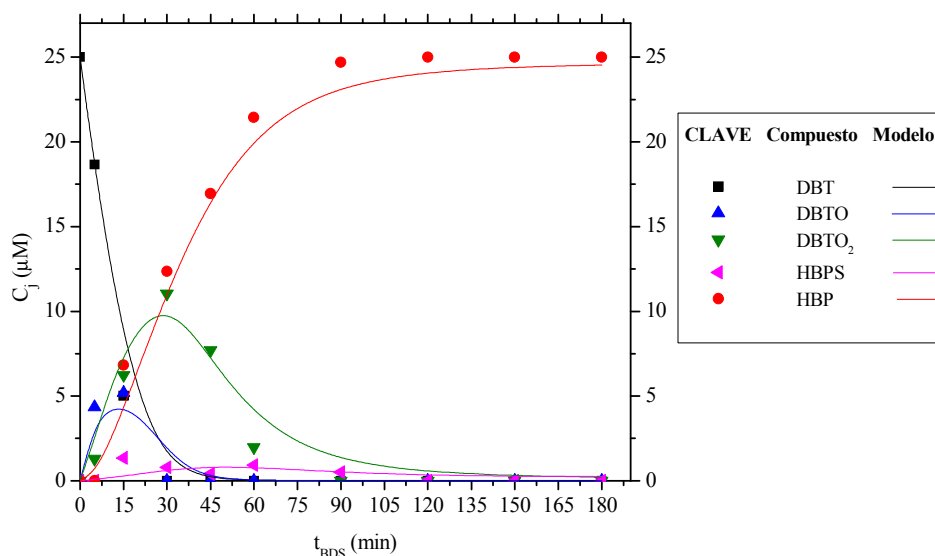


FIGURA 6.23 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 5h de edad en una concentración de biomasa de 3,5 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

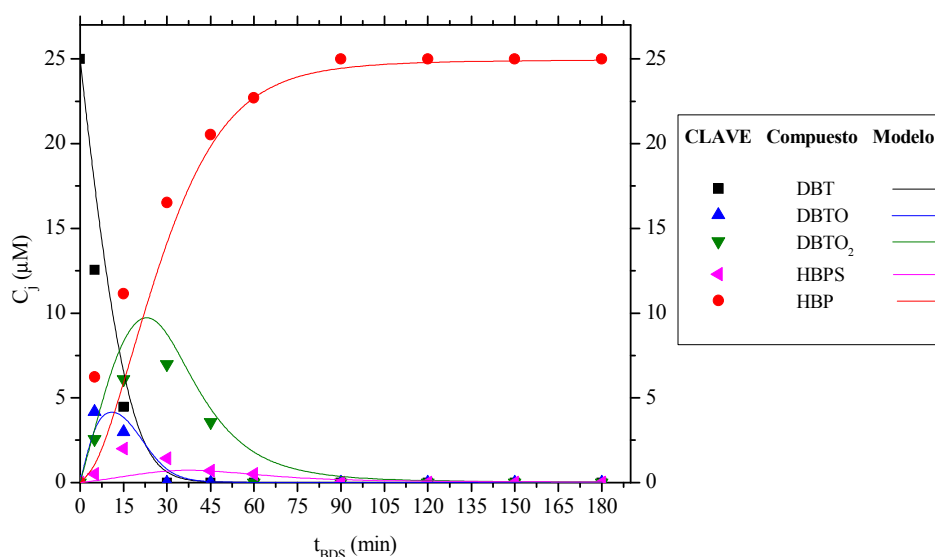


FIGURA 6.24 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 5h de edad en una concentración de biomasa de 4,2 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción sin considerar desactivación de la enzima DszB.

En la Figura 6.25 se representan los valores generados por el modelo frente a los correspondientes valores experimentales. La predicción del modelo cinético propuesto es bastante buena. Los errores son, por lo general, inferiores al 20 %, salvo en el caso de la predicción de concentraciones bajas para los cinco compuestos. Los compuestos que llevan asociado un mayor error de predicción son DBT, DBTO₂ y HBP.

Se han obtenido buenas predicciones de los cinco compuestos de la ruta 4S en todos los casos, empleando el modelo cinético seleccionado, que considera la pérdida de actividad de las enzimas DszC, DszA y DszB, implicadas. Los valores iniciales obtenidos mediante la aplicación del método de velocidades de reacción han permitido el cálculo de parámetros cinéticos válidos para las cuatro reacciones en un intervalo de concentración de células de 5 h de 0,7 a 4,2 g peso seco/L.

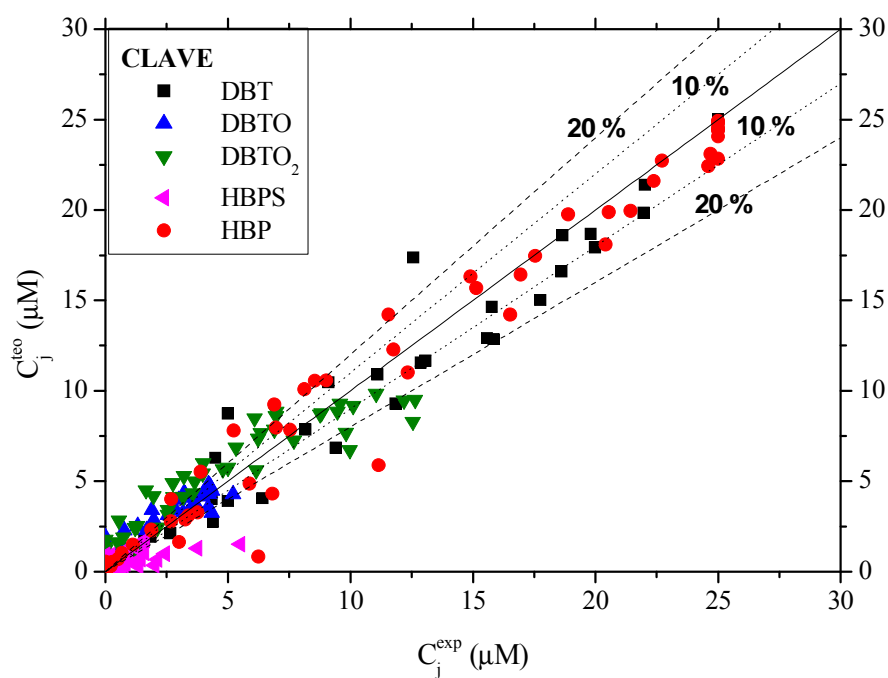


FIGURA 6.25 – Representación de los valores de concentración de cada uno de los compuestos de la ruta 4S que predice el modelo cinético, frente a los correspondientes valores experimentales, para células de 5 h de edad.

6.3.2.2 Células de 23 h de tiempo de crecimiento.

En este apartado se recogen los resultados del ajuste llevado a cabo sobre los datos experimentales de concentración de los compuestos de la ruta 4S en experimentos de desulfuración en condiciones de *resting cells* para diferentes concentraciones de biomasa. En la Tabla 6.32 se presentan los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos en el ajuste de seis experimentos con células de 23 h de edad y concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g peso seco/L.

A continuación, en las Figuras 6.26 a 6.31 se representan, respectivamente para cada una de las concentraciones de 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 y 4,2 g peso seco/L, los ajustes obtenidos para los cinco compuestos de la ruta 4S según el modelo cinético seleccionado y la evolución de los datos experimentales de concentración de cada uno de los compuestos de la ruta 4S.

TABLA 6.32– Parámetros cinéticos obtenidos al aplicar el método de velocidades de producción con células de 23 h de edad, sin considerar desactivación de la enzima DszB ($K'_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_4 = 9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ y $K'_5 = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético				t_s		F_F		SRC
				Calc.	Tab.	Calc.	Tab.	
k'1	$9,72 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,95 \cdot 10^{-2}$	(min ⁻¹)	1,970	11,326			
S1	$0,45 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,24 \cdot 10^{-2}$	(min ⁻¹)	1,970	3,676			
k'2	0,290	$\pm 0,072$	(min ⁻¹)	1,970	7,901			
S2	$1,28 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,44 \cdot 10^{-2}$	(min ⁻¹)	1,970	5,764			
k'3	0,162	$\pm 0,035$	(min ⁻¹)	1,970	9,149	333,575	1,244	2,363
S3	$2,12 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,33 \cdot 10^{-2}$	(min ⁻¹)	1,970	12,480			
k'4	0,226	$\pm 0,039$	(min ⁻¹)	1,970	11,326			
S4	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,32 \cdot 10^{-2}$	(min ⁻¹)	1,970	8,923			

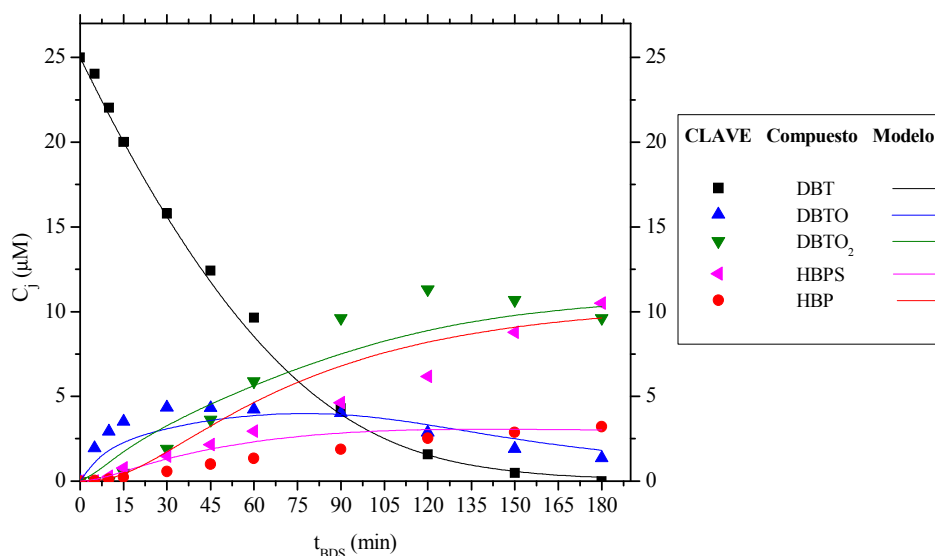


FIGURA 6.26 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 23h de edad en una concentración de biomasa de 0,7 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

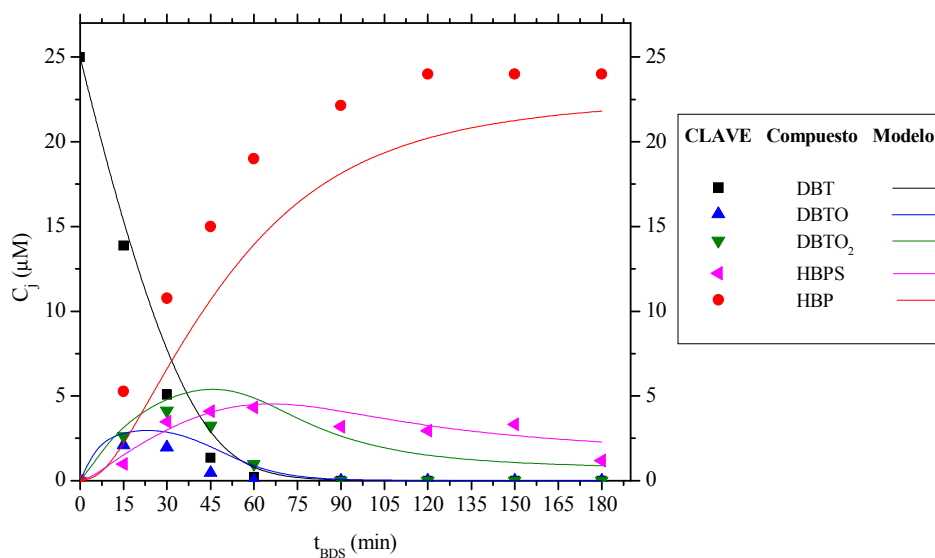


FIGURA 6.27 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 23h de edad en una concentración de biomasa de 1,4 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

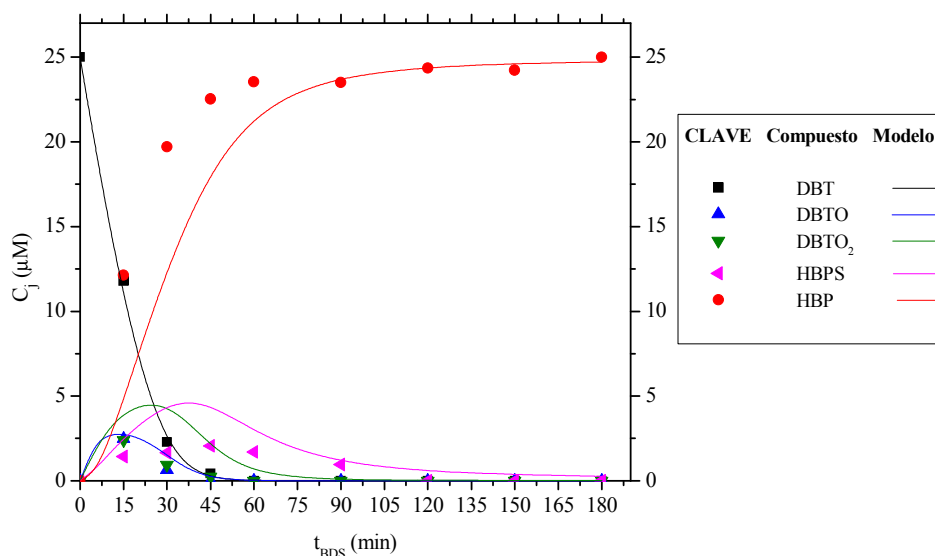


FIGURA 6.28 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 23h de edad en una concentración de biomasa de 2,1 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

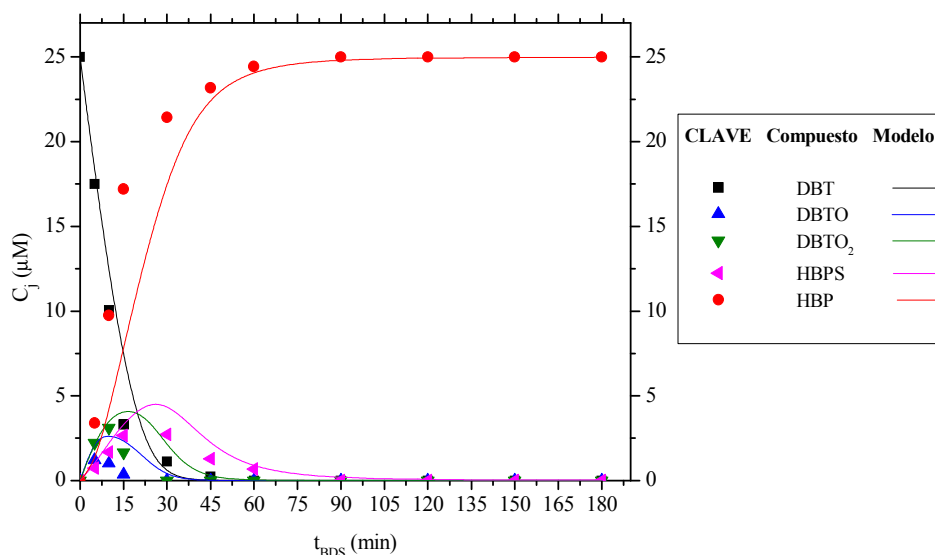


FIGURA 6.29 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 23h de edad en una concentración de biomasa de 2,8 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

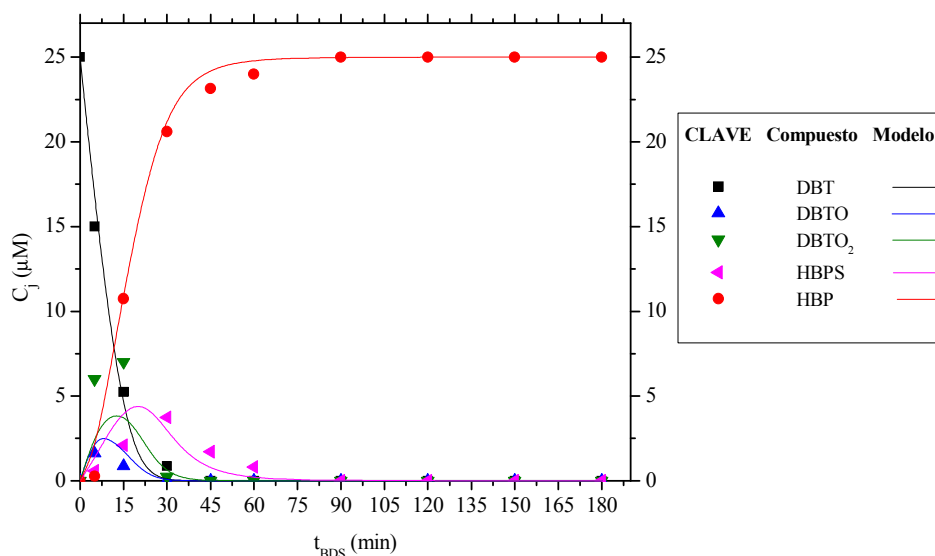


FIGURA 6.30 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 23h de edad en una concentración de biomasa de 3,5 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

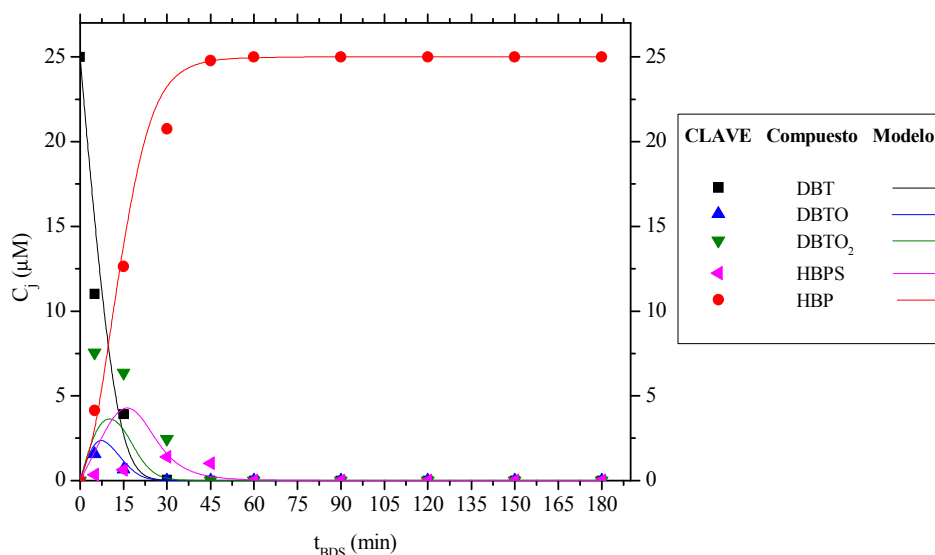


FIGURA 6.31 - Comparación de los valores experimentales y calculados en la evolución de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP frente al tiempo con células de 23h de edad en una concentración de biomasa de 4,2 g peso seco/L, al aplicar el método de velocidades de producción considerando desactivación de la enzima DszB.

En la Figura 6.32 se representan los valores generados por el modelo frente a los correspondientes valores experimentales. La predicción del modelo cinético propuesto es buena. Los errores son, por lo general, inferiores al 20 %, salvo en el caso de la predicción de concentraciones bajas para los cinco compuestos. En este caso, los mayores errores de predicción se presentan en los compuestos DBTO₂, HBPS y HBP.

Del mismo modo que al emplear datos experimentales de desulfuración con células de 5 h de edad, las predicciones obtenidas con células de 23 h de tiempo de crecimiento para los cinco compuestos de la ruta 4S, son satisfactorias. Si bien, los compuestos DBTO₂, HBPS y HBP presentan mejores predicciones en los casos de mayor biomasa empleada (2,8, 3,5 y 4,2 g peso seco/L).

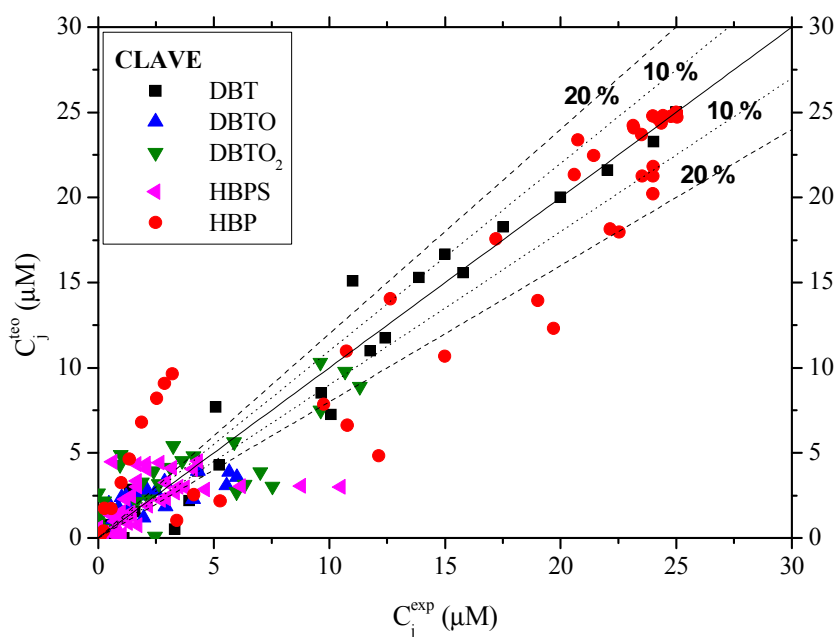


FIGURA 6.32 – Representación de los valores de concentración de cada uno de los compuestos de la ruta 4S que predice el modelo cinético, frente a los correspondientes valores experimentales, para células de 5 h de edad.

Los resultados obtenidos son coherentes con los estudios realizados previamente por el grupo FQPIMA, en que se propone el modelo que se ha ampliado en el presente trabajo (Alcón y col., 2008), considerando la concentración de biomasa empleada y la desactivación de las enzimas implicadas en la ruta 4S.

Los parámetros que resultan del ajuste según esta regresión no lineal en múltiple respuesta se recogen en la Tabla 6.33. Como se puede observar al comparar estos valores con los obtenidos al aplicar el método de velocidades de reacción, que se recogen en la Tabla 6.30., se comprueba la ventaja de emplear un método de respuesta múltiple para un sistema como éste, en el que se dan varias respuestas interrelacionadas no linealmente. Los parámetros obtenidos, además de cumplir los criterios estadísticos, presentan una mayor coherencia con los datos experimentales de partida y la información de que se dispone en el Capítulo 4 de la presente Memoria.

Así, dado que las células de 23 h de edad presentan una mayor actividad monooxigenasa que las de 5 h, los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros del modelo cinético presentan mayor coherencia con el sistema estudiado que los obtenidos mediante la aplicación del método de velocidades de reacción. De esta manera, los parámetros relacionados con la actividad de la enzima DszC, $k'_1{}^{23}$, $k'_2{}^{23}$ (a una edad celular de 23 h), y con la actividad de la enzima DszA, $k'_3{}^{23}$ (también para células de 23 h de edad), son mayores que los parámetros $k'_1{}^5$, $k'_2{}^5$ y $k'_3{}^5$ (respectivamente para estas enzimas y para células de 5 h de edad).

Análogamente, debido a que las células de 5 h de tiempo de crecimiento poseen una actividad en la enzima desulfínasa DszB mayor a la de las células de 23 h de edad, tiene más consistencia con la realidad y sentido físico que $k'_4{}^5$ (relacionado con la actividad de esta enzima en células de 5 h) sea mayor que el del parámetro $k'_4{}^{23}$ (para células de 23 h). La obtención de valores en los parámetros $S_1{}^{23}$ y $S_2{}^{23}$ menores que los valores de $S_1{}^5$ y $S_2{}^5$, pueden deberse a una desactivación más lenta de la enzima DszC a 23 h que a 5 h. Esto estaría de acuerdo con una menor influencia del tiempo en la desactivación de esta enzima en células de 23 h de edad, como se refleja en las diferencias tan pequeñas entre la bondad de los ajustes obtenidos mediante el método de velocidades de reacción en las dos primeras reacciones catalizadas por esta enzima y sobre datos experimentales obtenidos con células de 23 h de tiempo de crecimiento.

Se han obtenido, por tanto, valores aceptables y coherentes para los parámetros calculados para este modelo extendido que permite describir la desulfuración en condiciones de *resting cells* empleando biocatalizadores simples formados por células de *Pseudomonas putida* CECT5279 bien de 5, bien de 23 h de tiempo de crecimiento, en concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g peso seco/L.

TABLA 6.33 - Parámetros cinéticos del modelo cinético seleccionado ($K'_1 = 0,153 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_2 = 0,266 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_3 = 0,109 \mu\text{M}^{-1}$, $K'_4 = 9,18 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ y $K'_5 = 0,127 \mu\text{M}^{-1}$).

Parámetro cinético			
$k'_1{}^5$	$7,59 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,56 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$k'_1{}^{23}$	$9,72 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,95 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$S_1{}^5$	$1,62 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,23 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$S_1{}^{23}$	$0,46 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,24 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$k'_2{}^5$	0,154	$\pm 0,023$	(min^{-1})
$k'_2{}^{23}$	0,291	$\pm 0,072$	(min^{-1})
$S_2{}^5$	$1,75 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,32 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$S_2{}^{23}$	$1,28 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,44 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$k'_3{}^5$	$4,07 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,003$	(min^{-1})
$k'_3{}^{23}$	0,162	$\pm 0,035$	(min^{-1})
$S_3{}^5$	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$\pm 2,18 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$S_3{}^{23}$	$2,12 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,14 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$k'_4{}^5$	0,859	$\pm 0,046$	(min^{-1})
$k'_4{}^{23}$	0,226	$\pm 0,039$	(min^{-1})
$S_4{}^5$	$2,36 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,51 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})
$S_4{}^{23}$	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,32 \cdot 10^{-2}$	(min^{-1})

6.4 Predicción del comportamiento de mezclas de células de distinta edad

En el presente apartado se aborda la simulación de los resultados obtenidos al desulfurar DBT en condiciones de *resting cells*, mediante el empleo de un biocatalizador compuesto, formulado mediante la mezcla simultánea de células de 5 y 23 h de edad, a fin de aprovechar los elevados valores de actividad que presentan a cada tiempo de crecimiento respectivamente, la enzima desulfinaasa (DszB) y las enzimas monooxigenasas (DszC y DszA) de la ruta 4S, como se ha descrito en el Apartado 5.2.2 del Capítulo 5 de la presente Memoria.

Para llevar a cabo dicha simulación se ha empleado el modelo cinético desarrollado previamente en el Apartado 6.3.2, bajo la hipótesis de un comportamiento aditivo al mezclar las células de estos dos tiempos celulares. Es decir, se propone que al desulfurar simultáneamente con células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento la velocidad de producción de cada compuesto clave de la ruta 4S sea el resultado de la adición de las actividades que aporta cada tipo de células por separado, sin que sea necesario considerar las posibles interacciones entre las células de ambas edades. De esta manera, se emplean los parámetros cinéticos obtenidos para la desulfuración con biocatalizadores simples, de 5 y 23 h de edad celular, para conocer si al combinar de manera simultánea células de estos dos tiempos de crecimiento, se observa el efecto aditivo que se propone.

De acuerdo con lo anterior, en este modelo se expresa la velocidad de producción de cada compuesto clave como la suma de las velocidades de producción que origina la concentración de las células de cada edad presente en el medio. Este modelo resulta de la aplicación de las expresiones [6.27] a [6.30], particularizadas para cada edad celular, y acopladas, según la hipótesis descrita previamente, como se muestra en las expresiones [6.55] a [6.59].

Los valores de los parámetros cinéticos que se van a emplear en la simulación son los que se recogen en la Tabla 6.33, al final del apartado 6.2.3.2, como resultado de su determinación al realizar ajustes a partir de datos de desulfuración con células de 5 y 23 h sin combinar entre sí, para diferentes concentraciones de biomasa.

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = -\frac{k_1'^5 \cdot \exp(-S_1^5 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X^5}{1 + K_1'^5 \cdot C_{DBT}} - \frac{k_1'^{23} \cdot \exp(-S_1^{23} \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X^{23}}{1 + K_1'^{23}} \quad [6.55]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{DBTO}}{dt} = & \frac{k_1'^5 \cdot \exp(-S_1^5 \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X^5}{1 + K_1'^5 \cdot C_{DBT}} + \frac{k_1'^{23} \cdot \exp(-S_1^{23} \cdot t) \cdot C_{DBT} \cdot C_X^{23}}{1 + K_1'^{23} \cdot C_{DBT}} - \\ & - \frac{k_2'^5 \cdot \exp(-S_2^5 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X^5}{1 + K_2'^5 \cdot C_{DBTO}} - \frac{k_2'^{23} \cdot \exp(-S_2^{23} \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X^{23}}{1 + K_2'^{23} \cdot C_{DBTO}} \end{aligned} \quad [6.56]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = & \frac{k_2'^5 \cdot \exp(-S_2^5 \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X^5}{1 + K_2'^5 \cdot C_{DBTO}} + \frac{k_2'^{23} \cdot \exp(-S_2^{23} \cdot t) \cdot C_{DBTO} \cdot C_X^{23}}{1 + K_2'^{23} \cdot C_{DBTO}} - \\ & - \frac{k_3'^5 \cdot \exp(-S_3^5 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X^5}{1 + K_3'^5 \cdot C_{DBTO_2}} - \frac{k_3'^{23} \cdot \exp(-S_3^{23} \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X^{23}}{1 + K_3'^{23} \cdot C_{DBTO_2}} \end{aligned} \quad [6.57]$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{HBPS}}{dt} = & \frac{k_3'^5 \cdot \exp(-S_3^5 \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X^5}{1 + K_3'^5 \cdot C_{DBTO_2}} + \frac{k_3'^{23} \cdot \exp(-S_3^{23} \cdot t) \cdot C_{DBTO_2} \cdot C_X^{23}}{1 + K_3'^{23} \cdot C_{DBTO_2}} - \\ & - \frac{k_4'^5 \cdot \exp(-S_4^5 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X^5}{1 + K_5'^5 \cdot C_{HBP} + K_4'^5 \cdot C_{HBPS}} - \frac{k_4'^{23} \cdot \exp(-S_4^{23} \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X^{23}}{1 + K_5'^{23} \cdot C_{HBP} + K_4'^{23} \cdot C_{HBPS}} \end{aligned} \quad [6.58]$$

$$\frac{dC_{HBP}}{dt} = \frac{k_4'^5 \cdot \exp(-S_4^5 \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X^5}{1 + K_5'^5 \cdot C_{HBP} + K_4'^5 \cdot C_{HBPS}} + \frac{k_4'^{23} \cdot \exp(-S_4^{23} \cdot t) \cdot C_{HBPS} \cdot C_X^{23}}{1 + K_5'^{23} \cdot C_{HBP} + K_4'^{23} \cdot C_{HBPS}} \quad [6.59]$$

Como se ha explicado previamente, la simulación de los datos experimentales se ha llevado a cabo mediante el *software* Aspen Custom Modeler ®, siendo el método implícito de Euler con paso variable (Gautschi, 1997) el que se ha empleado en la integración numérica, como se describe en el Apartado 2.3 de la presente Memoria.

Los datos experimentales que se han empleado en la simulación de biocatalizadores complejos, formados por la combinación de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento, son los que se recogen en el Apartado 5.2.2 de esta Tesis Doctoral.

A continuación se muestran las simulaciones de algunas combinaciones de células de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento realizadas mediante el modelo formulado anteriormente. A modo de ejemplo se muestra la simulación de las combinaciones de células que se muestran en la Tabla 6.34.

TABLA 6.34 – Ejemplos de mezclas de células de 5 y 23 h de edad simuladas mediante el modelo cinético propuesto.

Código *	C_X^5	C_X^{23}
	(g peso seco /L)	(g peso seco /L)
M-9	0,7	1,4
M-12	2,1	0,7
M-13	1,4	1,4
M-18	1,4	2,1
M-21	2,1	2,1

* Se refiere al empleado en la Tabla 5.20 en el Apartado 5.2.2 de la presente memoria.

- **Simulación de la formulación del experimento M-9**

En la Figura 6.33 se representa la evolución de los datos experimentales de concentración de cada uno de los compuestos de la ruta 4S y los correspondientes valores que se obtienen al simular la desulfuración empleando concentraciones de biomasa de 0,7 g peso seco/L, para células de 5 h, y 1,4 g peso seco/L de células de 23 h de tiempo de crecimiento. Esta combinación de células de 5 y 23 h de edad fue seleccionada por la capacidad de este biocatalizador compuesto para lograr la desulfuración completa en un tiempo reducido y con un gasto de biomasa aceptable, como se muestra en el Apartado 5.2.2.2 de la presente Memoria.

Como se observa en la mencionada Figura 6.33, la predicción del modelo es bastante buena. Los valores calculados para DBT y DBTO se asemejan adecuadamente a los valores experimentales. Las predicciones de DBTO₂ y HBPS son bastante buenas también, aunque para grandes tiempos de operación, algunos valores de concentración que experimentalmente no se detectan, se predicen por exceso. El modelo genera valores alrededor de 1 μM para los correspondientes tiempos de ensayo. Esto afecta a la simulación de los valores de concentración de HBP, que aunque siguen una evolución muy coherente con los valores experimentales, presentan un ligero desfase en la zona intermedia de la curva, cuando ésta comienza a ser saturante.

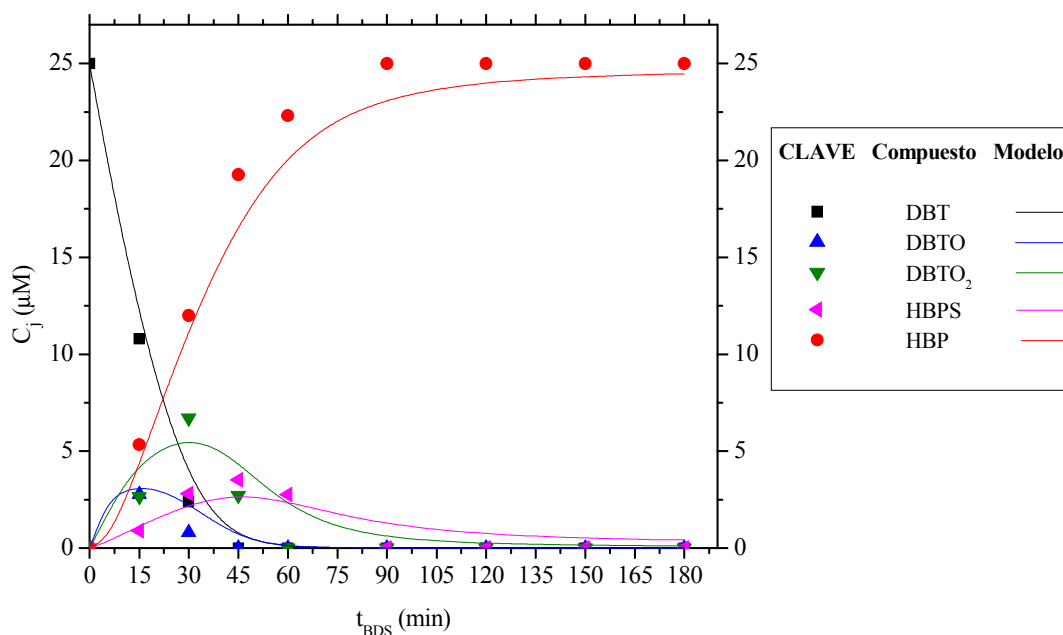


FIGURA 6.33 - Simulación de la desulfuración con un biocatalizador compuesto con 0,7 g peso seco/L de células de 5 h y 1,4 g peso seco/L de células de 23 h.

- **Simulación de la formulación del experimento M-12**

En la Figura 6.34 se representan los datos experimentales y calculados de evolución de los compuestos de la ruta 4S en la desulfuración de DBT empleando concentraciones de 2,1 g peso seco/L para células de 5 h y 0,7 g peso seco/L para las células de 23 h de tiempo de crecimiento.

A la vista de los datos de la citada Figura 6.34, la predicción que hace el modelo de los datos experimentales es aceptable desde el punto de vista de las tendencias de cada uno de los compuestos. Sin embargo, la caída de DBT que marca el modelo es algo más lenta que la experimental y, como consecuencia, la predicción del máximo en la evolución del intermedio DBTO₂ se retrasa unos 15 min en el tiempo de ensayo. La predicción de DBTO y HBPS es bastante buena, pero a causa de los valores de DBT y DBTO₂ calculados por exceso, la evolución del compuesto final, HBP, aumenta con un cierto desfase, aunque alcanza el valor de máxima conversión. Esta simulación describe la tendencia de los compuestos, pero no permite conocer con precisión los tiempos de máxima conversión o de desaparición de DBT y DBTO₂. La peor simulación de la

desulfuración mediante este biocatalizador compuesto se justifica a la vista de los peores resultados obtenidos previamente en el ajuste del modelo cinético propuesto para la respuesta HBP, como se pone de manifiesto en el apartado 6.3.2.2 de la presente Memoria.

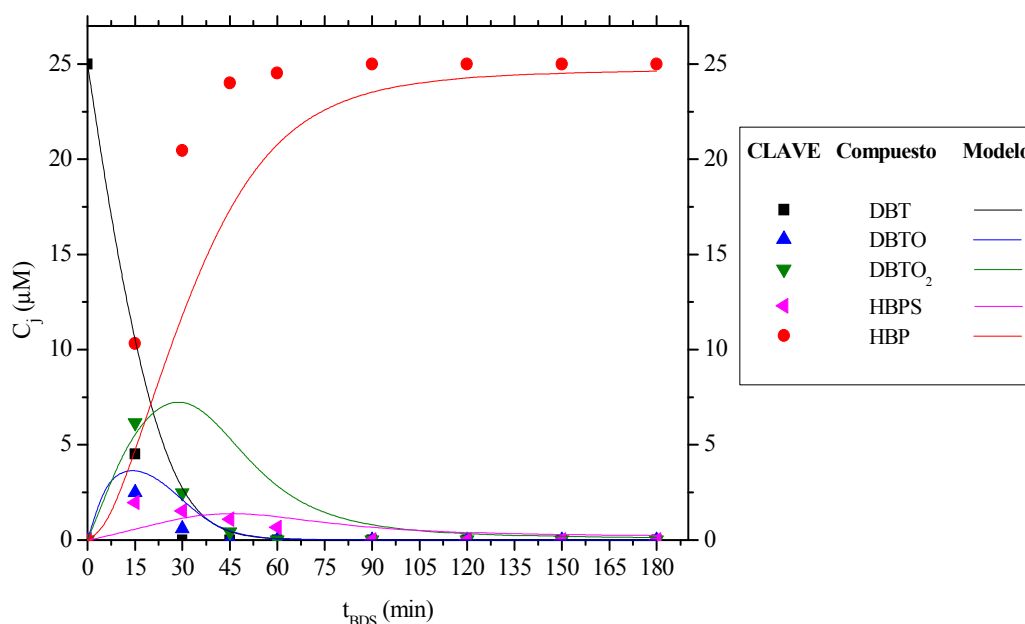


FIGURA 6.34 - Simulación de la desulfuración con un biocatalizador compuesto con 2,1 g peso seco/L de células de 5 h y 0,7 g peso seco/L de células de 23 h.

• Simulación de la formulación del experimento M-13

En la Figura 6.35 se representa la evolución de las concentraciones de DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP obtenidas experimentalmente y los correspondientes valores que se obtienen al simular la desulfuración empleando concentraciones de biomasa de 1,4 g peso seco/L para células de 5 h y 1,4 g peso seco/L de células de 23 h de tiempo de crecimiento. La simulación para esta formulación del biocatalizador, que se muestra en la Figura 6.35, es bastante correcta. La predicción de la evolución de los compuestos intermedios de la ruta 4S se ha conseguido satisfactoriamente. Asimismo, la evolución de los datos calculados para HBP se corresponde bastante bien con los valores experimentales y permite con bastante precisión predecir la conversión de DBT en cada momento. El modelo cinético propuesto permite una simulación correcta de esta mezcla de células.

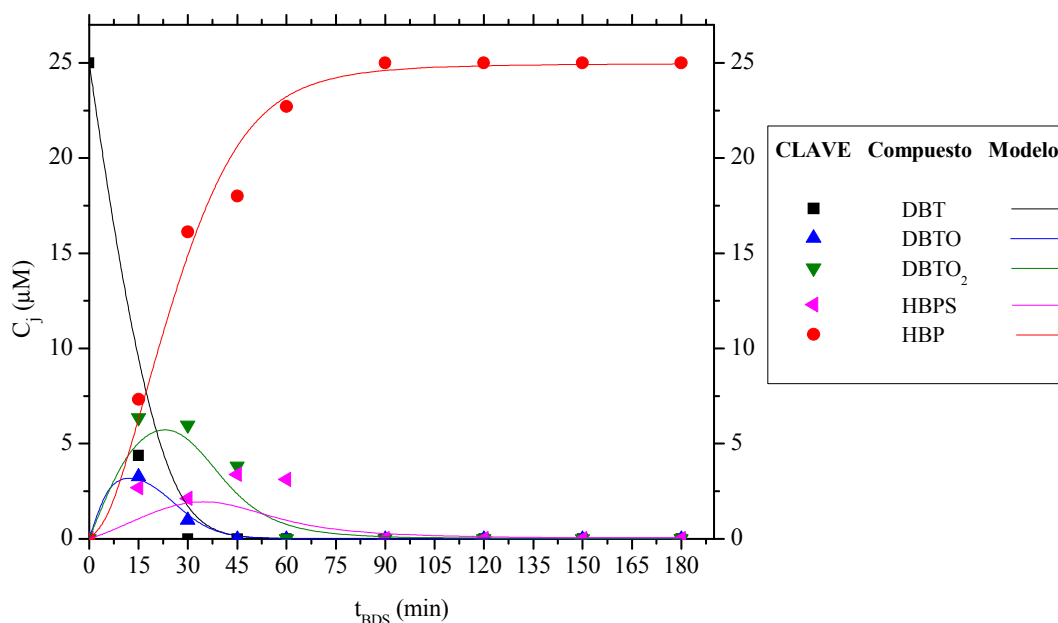


Figura 6.35 - Simulación de la desulfuración con un biocatalizador compuesto con 1,4 g peso seco/L de células de 5 h y 1,4 g peso seco/L de células de 23 h.

- **Simulación de la formulación del experimento M-18**

En la Figura 6.36 se compara la evolución de los valores experimentales de concentración para DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP y los valores que se obtienen al simular la desulfuración empleando concentraciones de biomasa de 1,4 g peso seco/L para células de 5 h y 2,1 g peso seco/L de células de 23 h de tiempo de crecimiento

La predicción de los datos experimentales al emplear esta formulación en el biocatalizador da muy buen resultado. El compuesto intermedio HBPS es el que se predice peor, puesto que el modelo no describe un máximo tan alto como el de los datos experimentales. Si bien, la predicción de los compuestos implicados es bastante buena.

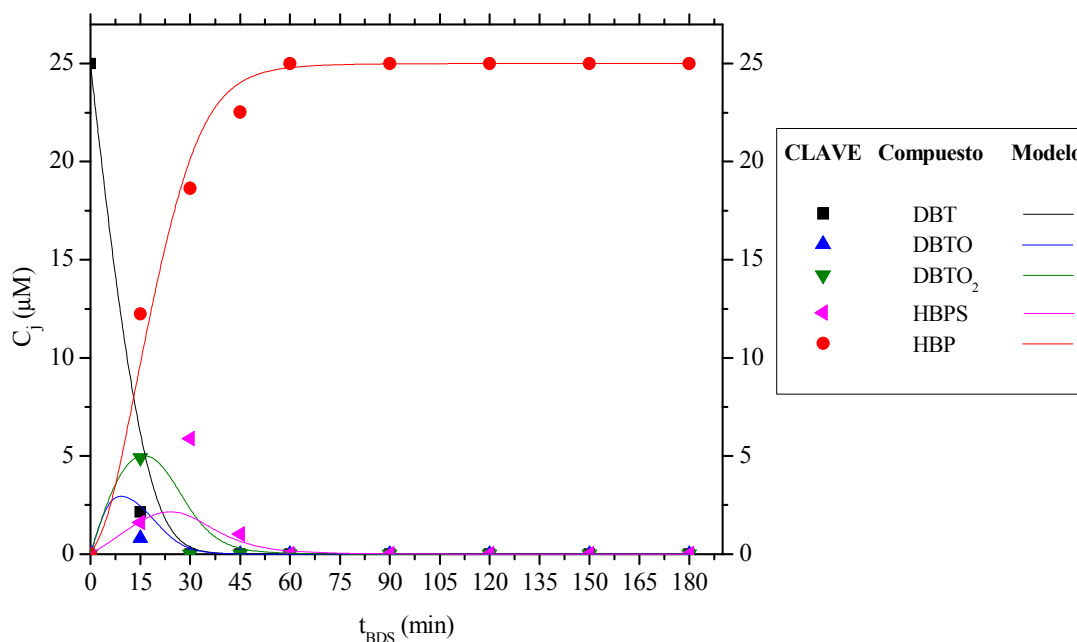


FIGURA 6.36 - Simulación de la desulfuración con un biocatalizador compuesto con 1,4 g peso seco/L de células de 5 h y 2,1 g peso seco/L de células de 23 h.

- **Simulación de la formulación del experimento M-21**

En la Figura 6.37 se muestra la evolución de las concentraciones de los compuestos de la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) obtenidas experimentalmente y los valores que se generan al simular la desulfuración combinando de manera simultánea concentraciones de biomasa de 2,1 g peso seco/L para células de 5 h y 2,1 g peso seco/L de células de 23 h de tiempo de crecimiento.

Se han obtenido muy buenos resultados en la aplicación del modelo cinético para la predicción de los valores de concentración de los compuestos de la ruta 4S. Únicamente se encuentran leves discrepancias entre los datos experimentales y calculados en el caso del intermedio DBTO₂. La predicción de la evolución del resto de los compuestos DBT, DBTO, HBPS y HBP es satisfactoria.

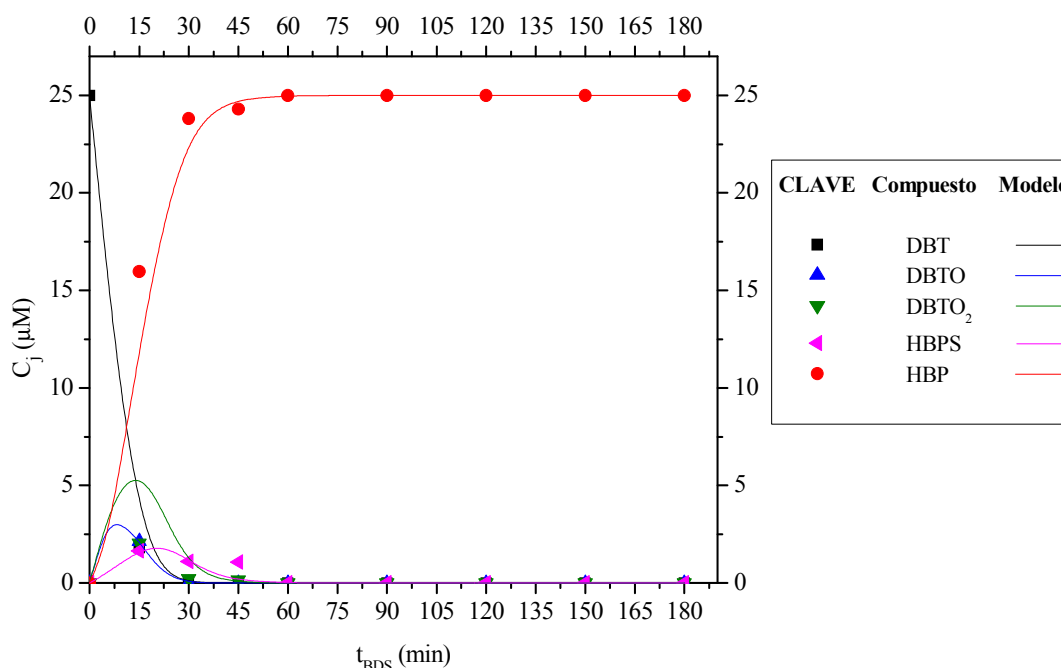


FIGURA 6.37 - Simulación de la desulfuración con un biocatalizador compuesto con 2,1 g peso seco/L de células de 5 h y 2,1 g peso seco/L de células de 23 h.

Se ha formulado un modelo cinético que describe el comportamiento en condiciones de *resting cells* de dos biocatalizadores simples: uno formado por células de 5 h de edad, y otro compuesto por células de 23 h de tiempo de crecimiento. En la mayoría de los casos se han obtenido buenos resultados en la predicción de la evolución de los compuestos de la ruta 4S mediante el modelo cinético propuesto. En algunos casos, la simulación de los datos experimentales es muy buena, y se pueden predecir correctamente los valores de conversión del proceso a lo largo del tiempo de ensayo.

Este modelo permite la simulación de los resultados experimentales con biocatalizadores compuestos por células de 5 y 23 h de edad de manera satisfactoria. Por lo tanto, parece aceptable la hipótesis adoptada de un comportamiento aditivo en la mezcla simultánea de células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de 5 y 23 h de tiempo de crecimiento, para la desulfuración de DBT en condiciones de reposo celular.

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

7 RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este capítulo se hace un resumen del trabajo realizado y se da cuenta de las conclusiones que se derivan de dicho trabajo.

7.1 Resumen

Las necesidades energéticas de la población mundial superaron en 2007 las 8280 Mtep y experimentan un crecimiento anual del 2,2 %. Esta creciente demanda de energía, asociada a una gran dependencia de los combustibles fósiles, tiene repercusiones a nivel global a causa de la emisión a la atmósfera de óxidos de azufre, entre otros contaminantes. Estos compuestos tienen conocidos efectos nocivos sobre la salud humana, el medio ambiente, los materiales de construcción y algunos dispositivos tecnológicos desarrollados por el hombre, lo que deriva en un considerable impacto económico asociado.

Existen diferentes tecnologías, en distinto nivel de desarrollo, cuyo objetivo es la eliminación en origen de los compuestos azufrados presentes en los combustibles fósiles, con el fin de prevenir estos problemas. La hidrosulfuración (HDS) es el proceso más frecuentemente empleado con esta intención, que se conoce y se viene aplicando a nivel industrial desde mediados del siglo pasado. Sin embargo, para eliminar determinados compuestos organosulfurados presentes en las fracciones petrolíferas mediante HDS son necesarias condiciones de operación bastante drásticas, empleando temperaturas de más de 250 °C y presiones del orden de 25-50 atm. Esto conlleva no sólo un consumo energético elevado, sino también un impacto económico importante. La biodesulfuración (BDS) se propone como una tecnología complementaria que, mediante un tratamiento biológico y en combinación con un proceso de HDS, permita una desulfuración efectiva y viable.

La molécula de dibenzotiofeno (DBT) se emplea como compuesto modelo en estudios de desulfuración por representar al conjunto de compuestos más difíciles de desulfurar tras un tratamiento convencional de HDS. En el grupo de investigación Físicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA) se ha estudiado la BDS de DBT empleando un microorganismo con capacidad desulfurante natural, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, y un microorganismo modificado genéticamente, *Pseudomonas putida* CECT5279. Este último ha sido desarrollado empleando técnicas

de Ingeniería Genética para dotarlo del material genético que permite a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 producir las enzimas necesarias para transformar DBT en un compuesto libre de azufre: hidroxibifenilo (HBP). La ruta metabólica que ambos microorganismos llevan a cabo para realizar esta transformación consiste en un esquema de cuatro reacciones en serie conocido como ruta 4S. En trabajos anteriores se han desarrollado procedimientos experimentales estandarizados para la obtención de ambos microorganismos en condiciones tales que permitan el desarrollo de las enzimas involucradas en la citada ruta 4S para actuar como biocatalizadores en la desulfuración de DBT.

En este trabajo se ha empleado *Pseudomonas putida* CECT5279 como biocatalizador en la desulfuración de DBT bajo diferentes condiciones de operación. En la literatura se presentan diferentes opciones para llevar a cabo procesos de desulfuración biológica tales como el empleo de extractos celulares, células enteras durante su crecimiento y células en condiciones de reposo celular, sin posibilidad de duplicarse, pero que mantienen las herramientas metabólicas para llevar a cabo la eliminación del azufre presente en la molécula de DBT. Se ha realizado un estudio previo para comparar la eliminación de DBT durante el crecimiento del microorganismo con dos concentraciones iniciales de DBT y la desulfuración en condiciones de *resting cells*, empleando cinco edades celulares escogidas a lo largo de la fase exponencial de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279. La desulfuración durante el crecimiento celular de esta bacteria ha resultado menos eficaz de cara a un posible proceso industrial. Sin embargo, los cinco experimentos realizados en condiciones de reposo celular han dado lugar a una eliminación de DBT más eficiente y, por otro lado, ha permitido observar un patrón de comportamiento particular en la eliminación de DBT y la producción de HBP. Se ha observado una capacidad de desulfuración máxima al emplear células de 9 h de edad en condiciones de *resting cells*. Estos resultados son coherentes con la información previa sobre este biocatalizador y su capacidad desulfurante (Martín, 2005; Santos y col., 2007).

El punto de partida de la investigación recogida en la presente Memoria son los conocimientos del proceso de desulfuración adquiridos en los trabajos previos realizados en el grupo de investigación FQPIMA. Estos trabajos demostraron la ausencia de limitaciones al transporte de los compuestos de la ruta 4S a través de la membrana celular de *Pseudomonas putida* CECT5279, y que la concentración

intracelular de equivalentes reducidos y la actividad de la enzima óxido-reductasa HpaC no son limitantes para la capacidad desulfurante de este biocatalizador. Todo esto sugiere la posibilidad de relacionar directamente la medida de los compuestos de la ruta 4S en el medio con la actividad intracelular de las enzimas involucradas en dicha ruta.

De esta manera, la primera parte de este trabajo consiste en **la medida de las actividades intracelulares que catalizan la ruta 4S**: las enzimas monooxigenasas DszC y DszA y la desulfinaasa DszB. Las características del biocatalizador permiten realizar esta medida mediante la aplicación del método diferencial directamente sobre datos de evolución de concentración en el caldo de cada uno de los sustratos correspondientes a estas enzimas. Para ello se realizaron 24 experimentos empleando seis edades celulares (3, 5, 9, 23, 30 y 46 h) en condiciones de *resting cell*, para estudiar así la eliminación de una concentración inicial de 10 μM de cada uno de estos cuatro sustratos. La evolución de estos compuestos se obtuvo mediante el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de la forma descrita en detalle en el Capítulo 2 de la presente Memoria. La aplicación de este método dio como resultado los patrones de actividad de cada enzima a lo largo del tiempo de crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279.

La evolución de las actividades intracelulares de las enzimas DszC y DszA, para distintas edades celulares del microorganismo, es diferente de la que muestra la enzima DszB. Las actividades de las enzimas monooxigenasas DszC y DszA presentan un máximo alrededor de las 23 horas de edad celular. Tras ese máximo, la enzima DszC sufre una pérdida de actividad conforme aumenta la edad celular, mientras que el valor medido de actividad de la enzima DszA se mantiene prácticamente constante. Sin embargo, la actividad de la enzima desulfinaasa DszB experimenta un crecimiento muy rápido a edades cortas hasta alcanzar un máximo alrededor de las 5 horas de edad celular y, a partir de este tiempo de crecimiento, tiene lugar una caída brusca de la actividad de esta enzima. Estos patrones diferentes en la actividad de las enzimas monooxigenasas y desulfinaasa permiten explicar, tal como se refleja en trabajos previos y en el estudio preliminar que se muestra en esta Memoria, la evolución de la capacidad desulfurante macroscópica de las células de *Pseudomonas putida* CECT5279 conforme crece la edad celular. De esta manera, la combinación de la actividad de cada una de las enzimas de la ruta 4S permite explicar el máximo en la capacidad desulfurante al

emplear células de 9 horas de tiempo de crecimiento, que es el resultado obtenido en trabajos previos de acuerdo a un análisis macroscópico (Martín, 2005).

Por otro lado, a raíz de encontrar un patrón de actividad para la enzima DszB a lo largo del tiempo de crecimiento diferente a los obtenidos para las monooxigenasas DszC y DszA, se ha desarrollado un método para la medida de la producción de la enzima DszB, en colaboración con el Departamento de Microbiología Molecular del C.I.B, basado en inmuno-transferencia Western-Blot. Se llevó a cabo un crecimiento del microorganismo para obtener muestras de biomasa de 5 edades celulares (5, 9, 23, 30 y 46 h) siguiendo un protocolo estandarizado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Estas muestras se analizaron para conocer la cantidad de proteína total, y se realizaron medidas, según el mencionado método de inmuno-transferencia, para conocer la producción de la proteína DszB para las células de distintas edades. Las medidas de la cantidad de la enzima DszB producida sobre la cantidad de proteína total generada por las células, a lo largo del tiempo de crecimiento, muestran un aumento progresivo con la edad celular. La creciente producción de la cantidad de enzima DszB es paralela a una pérdida de actividad de la misma a partir de las 5 h de edad celular, lo que hace pensar en una desactivación de la proteína DszB conforme aumenta la edad celular. Esta desactivación puede deberse a múltiples razones, pero muy probablemente esté causada por la oxidación por parte de alguno de los metabolitos generados durante el crecimiento.

Estas medidas de la actividad intracelular de las enzimas involucradas en la ruta 4S han permitido considerar la combinación de células de diferentes edades celulares singulares. En primer lugar, destacan las células de 5 h de edad, por presentar la mayor actividad en la enzima desulfinaasa DszB y una actividad moderada en la enzima monooxigenasas DszC. En segundo lugar, las células de 23 h de edad presentan la mayor actividad en las dos monooxigenasas DszC y DszA. Finalmente, de acuerdo con los estudios previos, las células de 9 h de tiempo de crecimiento presentan la mayor capacidad de desulfuración en un análisis macroscópico del sistema.

A raíz de estos resultados, se llevó a cabo la segunda parte del trabajo reflejado en la presente Memoria, que consiste en la **propuesta de diferentes formas de operación** para desulfurar con *Pseudomonas putida* CECT5279, basadas en el empleo de células de estas tres edades singulares en diferentes configuraciones bajo condiciones de *resting cells*.

Por un lado, se ha estudiado la desulfuración de DBT mediante el empleo de un biocatalizador simple formado únicamente por células de 9 h de tiempo de crecimiento. Se han llevado a cabo experimentos de desulfuración empleando DBT como compuesto modelo, variando la concentración de biomasa del biocatalizador. Se han realizado 6 experimentos empleando concentraciones de biomasa entre 0,7 y 4,2 g peso seco/L.

Por otro lado, se ha propuesto la combinación de células de 5 y 23 h de edad, debido a sus respectivas máximas actividades desulfinaasa y monooxigenasa, participando en la formulación de biocatalizadores compuestos. Con estas combinaciones se han probado dos maneras diferentes de operar. Una de las formas de operación consideradas ha sido la operación secuencial, de forma que la BDS se ha llevado a cabo en dos etapas sucesivas: en la primera etapa, se ha puesto en contacto el compuesto modelo DBT con células de 23 h de edad por su mayor actividad en las enzimas que catalizan las tres primeras reacciones de la ruta 4S; tras esta primera etapa, se ha retirado el biocatalizador, y el medio en el que trabajaron las células de mayor edad, se puso en contacto con células de 5 h de edad, por su mayor capacidad para llevar a cabo la última reacción de la ruta 4S, catalizada por la enzima DszB.

Otra de las formas de operación propuestas ha consistido en llevar a cabo la desulfuración de DBT también con un biocatalizador compuesto, formado por células de 5 y 23 h de edad, pero en una operación simultánea; de forma que se combinan al mismo tiempo células especializadas en catalizar las tres primeras reacciones de la ruta 4S y células con mayor capacidad para catalizar la última reacción de dicha ruta.

El estudio de la BDS de DBT empleando tanto biocatalizadores simples como compuestos, en operación secuencial o simultánea, se han comparado entre sí, y también con respecto a la desulfuración durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, realizada en los estudios preliminares que se muestran en la presente Memoria. En todos los casos, se ha empleado la misma concentración inicial de DBT. Para este estudio se han llevado a cabo 6 experimentos en condiciones de reposo celular con un biocatalizador simple, siendo la variable estudiada la concentración de células de 9 h de tiempo de crecimiento. Asimismo, se han realizado 9 experimentos para estudiar la desulfuración en condiciones de *resting cells* al emplear un biocatalizador compuesto en operación secuencial. Para ello, se han combinado diferentes concentraciones de biomasa, en cada etapa del proceso, entre 0,7 y 2,1 g peso seco/L, estudiando la influencia de la concentración de células de 5 y 23 h de edad en la eficacia del mismo.

Finalmente, para el estudio de la desulfuración de DBT con un biocatalizador compuesto en operación simultánea, se han realizado 22 experimentos en los que se combinan diferentes concentraciones de células de 5 y 23 h.

El empleo de un biocatalizador simple formado sólo por células de 9 h de edad dio lugar a buenos resultados desde diversos puntos de vista: la conversión de DBT en HBP, el tiempo de operación requerido, la velocidad inicial de eliminación de DBT y la productividad máxima alcanzada. Según estos parámetros, la desulfuración llevada a cabo con un biocatalizador compuesto en operación secuencial es tan eficaz como el empleo de células de 9 h. Sin embargo, el empleo de una operación de separación entre las dos etapas secuenciales, constituye una desventaja frente al empleo de células de 9 h de edad. No obstante, esta forma de operación debería ser considerada en caso de operar en continuo, como los grandes caudales a tratar puede hacer conveniente.

El uso de biocatalizadores compuestos en operación simultánea dio lugar al mejor resultado entre todas las formas de operación probadas. Se seleccionó la mejor combinación de células de 5 y 23 h de edad entre las mezclas propuestas, buscando la mayor conversión de DBT en el menor tiempo posible, con la menor concentración de biomasa total. La mejor combinación simultánea de células resultó al mezclar células de 5 y 23 h de edad en una relación 1:2 con una concentración total de biomasa de 2,1 g peso seco/L. Este biocatalizador compuesto aventajó tanto a los biocatalizadores simples propuestos, como a los biocatalizadores compuestos en operación secuencial. La desulfuración de DBT durante el crecimiento dio lugar al peor de los resultados de todas las formas de operación probadas, por necesitar un tiempo de operación mucho más prolongado para alcanzar el mismo grado de desulfuración, que las otras formas de operación propuestas.

Tras la selección del empleo de biocatalizadores compuestos en operación simultánea como mejor forma de operación, se ha llevado a cabo la tercera y última parte de este trabajo, que ha consistido en el **desarrollo de un modelo cinético** que permita la simulación del comportamiento de mezclas simultáneas de células de 5 y 23 h para desulfurar DBT. Para ello, se ha propuesto una ampliación de un modelo cinético desarrollado en estudios previos en el mismo grupo de investigación. Se han empleado datos de desulfuración de DBT con biocatalizadores simples de 5 y 23 h de edad, para calcular los parámetros cinéticos del modelo. Se ha utilizado como primera aproximación el método de velocidades de reacción mediante una regresión no lineal en

simple respuesta y, posteriormente, se han calculado los valores de los parámetros del modelo propuesto mediante la aplicación del método de velocidades de producción utilizando una regresión no lineal en múltiple respuesta.

La simulación de la BDS con mezclas de células de distinta edad se ha llevado a cabo mediante la aplicación de este modelo, que tiene en cuenta la concentración de células de cada edad empleada en la formulación del biocatalizador compuesto, bajo la hipótesis de un comportamiento aditivo al mezclar las células de estos dos tiempos celulares. De esta manera, se ha propuesto un modelo capaz de predecir la evolución de los compuestos implicados en la ruta 4S al combinar simultáneamente células de 5 y 23 h, a partir de los ajustes realizados sobre datos experimentales de desulfuración conseguidos con células de 5 y 23 h de edad separadamente.

7.2 Conclusiones

A continuación, se enumeran las conclusiones a las que se ha llegado como consecuencia del trabajo descrito.

Sobre el estudio preliminar.

En cuanto a la biodesulfuración durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279.

- 1.a) La desulfuración de DBT durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279 alcanza la conversión completa de DBT en HBP, si bien los tiempos de operación necesarios para alcanzar un grado de desulfuración del 100% son elevados, del orden de 8 y 24 horas, para la menor y mayor concentración inicial de sustrato azufrado, respectivamente, empleadas en el estudio que se refleja en el Apartado 3.2 de la presente Memoria.
- 1.b) El aumento de la concentración inicial de DBT provoca no sólo la reducción en la velocidad inicial de eliminación de este compuesto, sino también una pérdida en la velocidad específica de crecimiento del microorganismo, mostrando una lógica interdependencia entre crecimiento y desulfuración en esta forma de operación.

En cuanto a la biodesulfuración en condiciones de reposo celular.

- 2.a) La velocidad de desaparición de DBT es mayor según aumenta la edad de las células empleadas. Dicha velocidad crece conforme se utilizan células de 5, 9, y 23 h, aunque a partir de esta última edad celular, dicha velocidad disminuye notablemente.
- 2.b) La velocidad de producción de HBP experimenta un aumento considerable entre células de 5 y 9 h de tiempo de crecimiento, pero a partir de esta última edad celular, se reduce ligeramente la velocidad de producción.
- 2.c) Entre las diferentes edades celulares que se han empleado en este estudio preliminar, los mejores resultados se logran con células de 9 h de tiempo de crecimiento, que son las que consiguen una mayor y más rápida conversión de DBT en HBP.

Sobre la medida de las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S en *Pseudomonas putida* CECT5279.**En cuanto a la medida de actividades enzimáticas**

- 3.a) Se ha desarrollado un método de medida de las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S en *Pseudomonas putida* CECT5279, que consiste en el estudio de las reacciones de la ruta 4S de forma individual, a partir de la evolución de la concentración de los sustratos azufrados de cada una de las enzimas de esta ruta, recogidos a lo largo de experimentos estandarizados en *resting cells*, y mediante la aplicación del método diferencial para interpretar los datos conseguidos, a su vez, por un método de análisis por HPLC.
- 3.b) En colaboración con el Departamento de Microbiología Molecular del C.I.B., se ha desarrollado un segundo método capaz de determinar la concentración de la última enzima de la ruta 4S, mediante un procedimiento basado en electroforesis PAGE-SDS y transferencia Western-Blot.

En cuanto a los perfiles de actividad de cada enzima de la ruta 4S.

- 4.a) Las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S medidas en *Pseudomonas putida* CECT5279 muestran, a lo largo del tiempo de crecimiento, un comportamiento diferente según se trate de la monooxigenasa DszA, la monooxigenasa DszC o de la desulfínasa DszB.
- 4.b) La enzima DszC, que cataliza las dos primeras reacciones de la ruta 4S, experimenta una evolución creciente en su actividad a lo largo del tiempo de crecimiento, hasta la mitad de la fase exponencial. Alrededor de las 23 h de edad, las células presentan la mayor actividad (1,821 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ frente a DBT como sustrato en la primera reacción de la ruta y 1,685 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ frente a DBTO en la segunda reacción); a partir de esta edad, la actividad de esta enzima sufre una caída progresiva con el tiempo de crecimiento de las células. El comportamiento de la enzima DszC en las dos primeras reacciones es muy parecido a causa de las semejanzas estructurales entre las moléculas de DBT y DBTO, si bien, los valores de actividad medidos para la primera reacción son mayores que para la segunda.

Los valores de actividad registrados para esta enzima son mayores que los medidos para las otras enzimas, DszA y DszB.

- 4.c) La enzima DszA es responsable de catalizar la tercera reacción de la ruta 4S y, al igual que la enzima DszC, experimenta un aumento de actividad hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento, alrededor de 23 h de edad celular, donde presenta un máximo en su actividad. A diferencia de la monooxigenasa DszC, tras este máximo, la actividad de la enzima DszA presenta un comportamiento prácticamente saturante a edades celulares superiores a 23 h. El máximo de actividad medido para esta enzima ($0,972 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$) representa aproximadamente la mitad del valor obtenido para la enzima DszC en las dos primeras reacciones de la ruta 4S.
- 4.d) La desulfinasas DszB, que cataliza la eliminación del átomo de azufre en la última reacción de la ruta 4S, presenta un perfil de actividad a lo largo de la curva de crecimiento muy diferente al de las enzimas monooxigenasas DszC y DszA. Su máximo de actividad ($0,555 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$) se presenta a tiempos cortos de crecimiento, alrededor de las 5 h y, a partir de este tiempo, experimenta una pérdida brusca de actividad. Los valores de actividad intracelular medidos para esta enzima son claramente menores a los registrados para las otras enzimas de la ruta, lo que está de acuerdo con la información en la literatura, según la cual, la cuarta reacción de la ruta es la etapa controlante del proceso global (Gray y col., 1996; Santos y col., 2007).

En cuanto a la cuantificación de la proteína DszB producida.

- 5) La cantidad de proteína DszB producida a lo largo del tiempo de crecimiento presenta un aumento permanente. Esta evolución creciente, en contraste con la pérdida de actividad a partir de edades celulares tempranas, permite eliminar la hipótesis de una posible acción proteolítica que cause la destrucción de la enzima y hace pensar en una inactivación de la enzima DszB cada vez más intensa conforme aumenta la edad celular.

En cuanto a la detección de edades celulares singulares en *Pseudomonas putida* CECT5279

- 6.a) La medida de la evolución de las actividades intracelulares de las enzimas de la ruta 4S ha permitido conocer que las células de 5 h de edad de *Pseudomonas putida* CECT5279 presentan la mayor actividad en la enzima desulfínasa DszB, al mismo tiempo que una actividad razonable en la enzima monooxigenasa DszC y una actividad muy reducida en la enzima DszA, siendo las células de esta edad particularmente buenas para catalizar la última reacción de la ruta 4S.
- 6.b) Este estudio ha permitido detectar que las células de 23 h de edad de *Pseudomonas putida* CECT5279 presentan la mayor actividad en las enzimas monooxigenasas DszC y DszA, con una actividad muy reducida en la enzima DszB. Esta situación las hace particularmente adecuadas para catalizar las tres primeras reacciones de la ruta 4S.
- 6.c) Las células de *Pseudomonas putida* CECT5279 de 9 h de edad celular presentan la mayor capacidad desulfurante cuando se emplean en reposo, si se analizan los resultados macroscópicamente, como se había determinado en estudios previos (Santos y col., 2007; Calzada y col., 2009). La medida de las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S a lo largo de la edad celular ha permitido comprender que los perfiles de actividad de las enzimas DszC, DszA y DszB dan lugar a una combinación adecuada de actividades de dichas enzimas a la edad de 9 h, que hace que las células de este tiempo de crecimiento manifiesten la mayor capacidad de transformación de DBT en HBP, cuando se utilizan células de una única edad (catalizador simple).

Sobre las diferentes formas de operación propuestas para la desulfuración de dibenzotiofeno.

El conocimiento de estas tres edades singulares ha dado lugar al planteamiento de diferentes formas de operación en condiciones de *resting cells*. La primera, mediante el empleo de un biocatalizador simple formado únicamente por células de 9 h, por presentar la mayor capacidad desulfurante. Y la segunda, mediante el empleo de biocatalizadores compuestos, que consisten en la combinación de células de 23 y de

5 h de edad celular, por sus respectivas máximas actividades monooxigenasas y desulfinasas, bien sea en una operación secuencial, bien de manera simultánea.

En cuanto al empleo de un biocatalizador simple de 9 h de edad.

- 7.a) El empleo de concentraciones de biomasa crecientes de células de 9 h permite la aceleración de la desaparición del compuesto de partida, DBT, la menor acumulación de compuestos intermedios, DBTO, DBTO₂ y HBPS, y la mayor velocidad de producción de HBP.
- 7.b) Es necesario emplear concentraciones de biomasa superiores a 2,1 g peso seco/L para conseguir la conversión completa de DBT en HBP ($X_{BDS}^{max} = 100\%$), de forma que, a medida que se utilizan concentraciones mayores (2,8; 3,5 y 4,2 g peso seco/L) se reduce el tiempo de operación para lograr la desulfuración total hasta un valor de 150 min.
- 7.c) La velocidad inicial de desaparición de DBT, R_{DBT}^0 , aumenta desde 0,417 a 2,603 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ conforme va aumentando la concentración de biomasa en el biorreactor, gracias a la actividad moderadamente alta de la enzima DszC frente a DBT para esta edad celular (1,455 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$).
- 7.d) La productividad máxima alcanza un valor de 0,667 %/min al emplear una concentración de biomasa de 3,5 g peso seco/L, indicando que no es eficaz un aumento ilimitado de la biomasa de cara a lograr una elevada transformación de DBT en HBP en el menor tiempo posible. Las bajas actividades en las enzimas DszA y DszB en células de 9 h de edad explican que no se alcancen mejoras proporcionales al aumento de biomasa, y que la eficiencia del biocatalizador no mejore por encima de concentraciones de biomasa de 3,5 g peso seco/L.

En cuanto al empleo de un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h de edad en operación secuencial.

- 8.a) Se ha demostrado la posibilidad de llevar a cabo esta forma de operación secuencial que consiste en dos etapas. En la primera de ellas, se ha puesto en

contacto un medio tamponado con DBT y células de 23 h, por su mayor capacidad para catalizar las tres primeras reacciones; y en la segunda de ellas, se han empleado células de 5 h de edad para catalizar la cuarta y última reacción de la ruta 4S, completando así la acción realizada por las células de la primera etapa.

- 8.b) A medida que se emplean mayores concentraciones totales de biomasa se logran mayores grados de desulfuración, si bien, la operación es más eficiente al emplear una mayor concentración de células de 23 h en la primera etapa que de células de 5 h en la segunda; esto es, se reduce el tiempo de operación y la cantidad de biomasa empleada. Esto se debe a la capacidad de las células de 23h para catalizar las tres primeras reacciones por su elevada actividad en las enzimas monooxigenasas DszC y DszA. Gracias a la mayor concentración de estas células se logra aumentar la velocidad de eliminación de DBT y reducir la acumulación de los compuestos intermedios de la ruta 4S. En los casos en que se ha empleado una concentración de 2,1 g de biomasa/L, en esta primera etapa, se consigue la conversión completa de DBT en HBP gracias a que la pequeña actividad de la enzima DszB en células de 23 h se ve compensada por la alta actividad de las enzimas DszC y DszA para grandes concentraciones de biomasa.
- 8.c) Las células de 5 h de edad, por su elevada actividad en la enzima DszB, juegan un papel importante en este tipo de operación porque permiten acelerar sustancialmente la transformación de HBPS en HBP, aumentando notablemente la eficiencia del proceso.
- 8.d) La mejora de este proceso implica la optimización del tiempo de operación de la primera etapa, de forma que se podría realizar la operación con una mayor transformación de DBT en HBP, en un menor tiempo de operación y con una inversión más reducida de biomasa.

El punto débil de esta forma de operación es la necesaria separación para retirar las células de 23 h empleadas en la primera etapa, antes de poner el medio en contacto con las células de 5 h de edad. El empleo de una etapa de separación intermedia entre las dos fases de desulfuración puede ser un problema desde el punto de vista de su aplicación industrial tanto a nivel técnico como económico. Sin embargo, si se piensa en una operación en continuo para el gasóleo a desulfurar, pasando primero por una etapa con células de 23 h y luego por otra, con células de 5 h, en discontinuo para las células, este inconveniente se elimina, sobre todo si, como se ha empezado a estudiar, existiera

un medio físico de separación (una membrana) entre la fase acuosa (donde se encuentran las células) y la fase orgánica que se desea tratar. Sería necesario completar este estudio en continuo.

En cuanto al empleo de un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h de edad en operación simultánea.

- 9.a) La combinación de células de 5 y 23 h de edad mejora los resultados obtenidos si se compara con el empleo de biocatalizadores simples, para iguales concentraciones totales de biomasa, en lo que se refiere a la eliminación de DBT en menores tiempos y a la producción más rápida de HBP. En el caso particular de emplear solamente células de 23 h en una concentración de 1,4 g peso seco/L, la baja actividad de la enzima desulfínasa DszB se compensa con la alta actividad de las enzimas monooxigenasas DszC y DszA. En el resto de los casos probados, las mezclas de células de diferente edad han proporcionado mejores resultados que el empleo aislado de células de 5 y 23 h.
- 9.b) En todos los casos, el empleo exclusivo de células de 5h de edad en la formulación del biocatalizador da peores resultados que las mezclas de células de diferentes edades, o el uso de células de sólo 23 h de edad. Esto se debe a la escasa actividad de la enzima DszA que limita la catálisis de la tercera reacción de la ruta 4S.
- 9.c) El empleo de células de 23 h de edad en la formulación del catalizador en proporciones del 50% o mayor proporciona los mejores resultados de eliminación de DBT y de producción de HBP, gracias a su elevada actividad en las enzimas monooxigenasas DszC y DszA, y a la pequeña actividad en la desulfínasa DszB, que se compensa al aumentar la concentración de estas células en la formulación del biocatalizador.
- 9.d) Aunque no se necesita una composición mayoritaria de células de 5 h de edad en la formulación del biocatalizador, su presencia mejora los resultados obtenidos al emplear exclusivamente células de 23 h., reduciendo el tiempo de operación y mejorando así la eficiencia del proceso.
- 9.e) La conversión total de DBT se alcanza, en todos los casos, al emplear concentraciones totales de biomasa superiores a 2,1 g peso seco/L.
-

En cuanto a la búsqueda de la mejor formulación de un biocatalizador compuesto por células de 5 y 23 h de edad en operación secuencial.

- 10.a) De entre las mezclas de células de 5 y 23 h empleadas en este trabajo, se ha buscado la mejor formulación para lograr la mayor transformación de DBT en HBP, en el menor tiempo y con la menor inversión posible de biomasa. Para ello, se ha escogido como criterio el grado de desulfuración específico, E definido por la expresión siguiente:

$$E = \frac{X_{BDS}^{m\acute{a}x}}{t_{BDS}^{X_{BDS}^{m\acute{a}x}} \cdot C_X^{5+23}}$$

El mayor grado de desulfuración específico (0,529 %·L/g/min) se alcanza cuando la concentración total de biomasa es de 2,1 peso seco/L y la fracción másica de células de 23 h de edad es de 0,67, es decir, cuando el biocatalizador está formado por un 33 % de células de 5 h de edad y un 67 % de células de 23 h de edad.

- 10.b) El empleo de mayores concentraciones totales de biomasa no compensa desde el punto de vista del aprovechamiento de las células para desulfurar DBT en condiciones de *resting cells*, desde un punto de vista industrial, donde un ahorro en biomasa se traduciría en una reducción del volumen de equipo, en el caso de llevar a cabo el proceso en un sistema continuo o semicontinuo.

En cuanto a la comparación entre las formas de operación propuestas.

- 11.a) Al comparar la formulación seleccionada para un biocatalizador compuesto en operación simultánea y la desulfuración durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* CECT5279, en ambos casos partiendo de DBT 25 µM, se aprecia que la operación en condiciones de *resting cells* aventaja a la operación durante el crecimiento según los diferentes criterios considerados en este trabajo. Aunque en ambos casos se consiguen grados de desulfuración del 100%, el tiempo necesario para desulfurar la misma concentración de DBT durante el crecimiento es de 480 min, frente a los 90 min que necesita el biocatalizador compuesto en condiciones de células en reposo. La velocidad inicial de eliminación de DBT es casi el doble al trabajar con el biocatalizador compuesto (1,714 µmol/l/min) que al desulfurar durante el crecimiento (1,015 µmol/L/min). Se obtienen valores máximos de

productividad y de grado de desulfuración específico mediante este biocatalizador compuesto (1,111 %/min y 0,529 %·g/L/min) que mejoran notablemente los que se alcanzan durante el crecimiento (0,208 %/min y 0,262 %·g/L/min).

- 11.b) En la comparación de este biocatalizador compuesto y el biocatalizador simple de 9 h con la misma concentración de biomasa, se comprueba la considerable mejora que supone combinar células de máxima actividad en las enzimas monooxigenasas y células de máxima actividad en la enzima desulfinasa. Mientras que el empleo del biocatalizador simple logra un grado de desulfuración del 83,6%, el biocatalizador compuesto consigue la conversión total de DBT en HBP. El tiempo que necesitan las células de 9 h para alcanzar dicho grado de desulfuración es de 180 min, mientras que con el biocatalizador compuesto, se reduce este tiempo a la mitad (90 min). Se ha conseguido aumentar la velocidad inicial de eliminación de DBT al emplear el biocatalizador compuesto (1,714 $\mu\text{mol/l/min}$) en comparación con el empleo de células de 9 h (1,022 $\mu\text{mol/l/min}$). Los valores de productividad máxima y grado de desulfuración específico obtenidos mediante este biocatalizador compuesto (1,111 %/min y 0,529 %·g/L/min) duplican los obtenidos al utilizar un biocatalizador simple de 9 h (0,465 %/min y 0,221 %·g/L/min).
- 11.c) Al comparar el empleo de biocatalizadores compuestos en operación secuencial y en operación simultánea, se observa que, aunque algunas combinaciones secuenciales logran alcanzar el grado de desulfuración del 100%, ninguna de las combinaciones logra hacerlo en un tiempo de operación inferior a 150 min. Sin embargo, al emplear concentraciones de biomasa en la primera etapa con células de 23 h, se logran velocidades iniciales de eliminación de DBT ((1,638 $\mu\text{mol/l/min}$) próximas a las alcanzadas mediante el empleo del biocatalizador compuesto (1,714 $\mu\text{mol/l/min}$). En ningún caso se han obtenido valores en la productividad máxima, ni en el grado específico de desulfuración, superiores a los generados mediante la formulación seleccionada para el biocatalizador compuesto.

Sobre el modelo cinético para la descripción de biocatalizadores compuestos en operación simultánea.

En cuanto a la obtención del modelo cinético

12) Se ha ampliado un modelo cinético que describe la evolución de los compuestos implicados en la ruta 4S: DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP. Para ello se ha considerado la pérdida de actividad que pueden sufrir las enzimas DszC, DszA y DszB durante el tiempo de operación, y la concentración de biomasa de las células de 5 y de 23 h que participan como biocatalizador compuesto en operación simultánea.

Para la determinación de los parámetros cinéticos se han empleado datos experimentales obtenidos a partir de ensayos de desulfuración con biocatalizadores simples de 5 y 23 h de edad celular.

Se ha empleado el método de velocidades de reacción (García-Ochoa y col., 2004) en su forma integral para obtener una primera aproximación de los valores de los parámetros, estudiando mediante regresión no lineal en simple respuesta cada una de las cuatro reacciones de la ruta 4S.

Los valores obtenidos mediante el método anterior se han empleado como valores iniciales para aplicar el método de velocidades de producción, mediante regresión no lineal en múltiple respuesta, pudiendo así describir la evolución de los compuestos de la ruta 4S según las siguientes ecuaciones, a una temperatura de 30 °C:

$$\frac{dC_{DBT}}{dt} = - \frac{(7,59 \cdot 10^{-2} \pm 0,56 \cdot 10^{-2}) \exp(-(1,62 \cdot 10^{-2} \pm 0,23 \cdot 10^{-2})t) C_{DBT} \cdot C_X^5}{1 + 0,153 \cdot C_{DBT}} -$$

$$- \frac{(9,72 \cdot 10^{-2} \pm 0,95 \cdot 10^{-2}) \exp(-(0,46 \cdot 10^{-2} \pm 0,24 \cdot 10^{-2})t) C_{DBT} \cdot C_X^{23}}{1 + 0,153 \cdot C_{DBT}}$$

$$\frac{dC_{DBTO}}{dt} = \frac{(7,59 \cdot 10^{-2} \pm 0,56 \cdot 10^{-2}) \exp(-(1,62 \cdot 10^{-2} \pm 0,23 \cdot 10^{-2})t) C_{DBT} \cdot C_X^5}{1 + 0,153 \cdot C_{DBT}} +$$

$$\begin{aligned}
& + \frac{(9,72 \cdot 10^{-2} \pm 0,95 \cdot 10^{-2}) \exp(- (0,46 \cdot 10^{-2} \pm 0,24 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBT} \cdot C_X^{23}}{1 + 0,153 \cdot C_{DBT}} - \\
& - \frac{(0,154 \pm 0,023) \exp(- (1,75 \cdot 10^{-2} \pm 0,32 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO} \cdot C_X^5}{1 + 0,266 \cdot C_{DBTO}} - \\
& - \frac{(0,291 \pm 0,072) \exp(- (1,28 \cdot 10^{-2} \pm 0,44 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO} \cdot C_X^{23}}{1 + 0,266 \cdot C_{DBTO}} \\
\frac{dC_{DBTO_2}}{dt} = & \frac{(0,154 \pm 0,023) \exp(- (1,75 \cdot 10^{-2} \pm 0,32 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO} \cdot C_X^5}{1 + 0,266 \cdot C_{DBTO}} + \\
& + \frac{(0,291 \pm 0,072) \exp(- (1,28 \cdot 10^{-2} \pm 0,44 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO} \cdot C_X^{23}}{1 + 0,266 \cdot C_{DBTO}} - \\
& - \frac{(4,07 \cdot 10^{-2} \pm 0,32 \cdot 10^{-2}) \exp(- (1,44 \cdot 10^{-2} \pm 2,18 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO_2} \cdot C_X^5}{1 + 0,109 \cdot C_{DBTO_2}} - \\
& - \frac{(0,162 \pm 0,035) \exp(- (2,12 \pm 0,14 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO_2} \cdot C_X^{23}}{1 + 0,109 \cdot C_{DBTO_2}} \\
\frac{dC_{HBPS}}{dt} = & \frac{(4,07 \cdot 10^{-2} \pm 0,32 \cdot 10^{-2}) \exp(- (1,44 \cdot 10^{-2} \pm 2,18 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO_2} \cdot C_X^5}{1 + 0,109 \cdot C_{DBTO_2}} + \\
& + \frac{(0,162 \pm 0,035) \exp(- (2,12 \pm 0,14 \cdot 10^{-2}) t) C_{DBTO_2} \cdot C_X^{23}}{1 + 0,109 \cdot C_{DBTO_2}} - \\
& - \frac{(0,859 \pm 0,046) \exp(- (2,36 \cdot 10^{-2} \pm 0,51 \cdot 10^{-2}) t) C_{HBPS} \cdot C_X^5}{1 + 9,18 \cdot 10^{-2} \cdot C_{HBPS} + 0,127 \cdot C_{HBP}} - \\
& - \frac{(0,226 \pm 0,039) \exp(- (1,44 \cdot 10^{-2} \pm 0,32 \cdot 10^{-2}) t) C_{HBPS} \cdot C_X^{23}}{1 + 9,18 \cdot 10^{-2} \cdot C_{HBPS} + 0,127 \cdot C_{HBP}} \\
\frac{dC_{HBP}}{dt} = & \frac{(0,859 \pm 0,046) \exp(- (2,36 \cdot 10^{-2} \pm 0,51 \cdot 10^{-2}) t) C_{HBPS} \cdot C_X^5}{1 + 9,18 \cdot 10^{-2} \cdot C_{HBPS} + 0,127 \cdot C_{HBP}} + \\
& + \frac{(0,226 \pm 0,039) \exp(- (1,44 \cdot 10^{-2} \pm 0,32 \cdot 10^{-2}) t) C_{HBPS} \cdot C_X^{23}}{1 + 9,18 \cdot 10^{-2} \cdot C_{HBPS} + 0,127 \cdot C_{HBP}}
\end{aligned}$$

En cuanto a la simulación de mezclas simultáneas de células de 5 y 23 h de edad

- 13) Mediante este modelo cinético ha sido posible simular la evolución de las concentraciones de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP que se obtiene al llevar a cabo la desulfuración con biocatalizadores compuestos formados por mezclas simultáneas de células de 5 y 23 h de edad, en diferentes concentraciones totales de biomasa y proporciones de estos dos tipos de células.

El modelo obtenido por ajuste a los datos experimentales de desulfuración con biocatalizadores simples (formulados exclusivamente con células de 5 h o con células de 23 h) permite describir el comportamiento de mezclas de células de 5 y 23 h mezcladas según la hipótesis de un efecto aditivo de las características de estas edades celulares sobre las velocidades de cada reacción de la ruta 4S, lo que es un resultado muy bueno, que ofrece una idea de la robustez del modelo cinético conseguido.

8. NOMENCLATURA

8 NOMENCLATURA

a_i :	Actividad de la enzima i , expresada como extrapolación a tiempo cero de la velocidad de desaparición de su sustrato y referida al valor de biomasa ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$).
A_{DszB} :	Absorbancia de la banda correspondiente a la proteína DszB en una membrana de nitrocelulosa tras aplicar la metodología Western-Blot (UA/g peso seco).
$A(\lambda)$:	Absorbancia medida a λ nm de longitud de onda (UA).
$A_t(\lambda)$:	Área del pico que eluye a t minutos medida a λ nm de longitud de onda (UA·min).
BSM:	Medio salino mínimo (Basal Salt Medium) empleado durante el crecimiento del microorganismo en fermentador.
C_j :	Concentración del compuesto j (μM) (g en peso seco /L).
DBT:	Dibenzotiofeno.
DBTO:	Dibenzotiofeno-5-óxido (sulfóxido).
DBTO₂:	Dibenzotiofeno-5,5-dióxido (sulfona).
<i>dszA</i> :	Gen que codifica la proteína DszA, dentro del operón <i>dszABC</i> .
<i>dszB</i> :	Gen que codifica la proteína DszB, dentro del operón <i>dszABC</i> .
<i>dszC</i> :	Gen que codifica la proteína DszC, dentro del operón <i>dszABC</i> .
DszA:	Segunda enzima monooxigenasa de la ruta 4S que cataliza la transformación de DBTO ₂ en HBPS.
DszB:	Enzima desulfinasas de la ruta 4S que cataliza la transformación de HBPS en HBP.

DszC:	Primera enzima monooxigenasa de la ruta 4S que cataliza la transformación de DBT en DBTO, y posteriormente en DBTO ₂ .
DszD:	Enzima flavin:NADH reductasa presente en <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8, que cataliza la transformación de NADH+H ⁺ en el FMNH ₂ que necesitan las tres primeras reacciones de la ruta 4S.
E :	Grado de desulfuración específico (%·g/L/min).
f(C_P):	Función de la concentración de <i>P</i> componentes.
F_F:	Parámetro estadístico <i>F de Fisher</i> .
FMN:	Mononucleótido de flavina.
FMNH₂:	Mononucleótido de flavina reducido.
HBP:	2-hidroxibifenilo.
HBPS:	2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato (sulfinato)
HpaC:	Enzima flavin:NADH oxidorreductasa, presente en <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 y procede de <i>E. coli</i> W, que cataliza la transformación de NADH+H ⁺ en el FMNH ₂ que necesitan las tres primeras reacciones de la ruta 4S.
HPLC	Siglas inglesas de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
k_i	Parámetro cinético relacionado con la velocidad de transformación de la reacción <i>i</i> , (μmol/L/min).
k_i'	Parámetro cinético que relaciona k _i y K _i de la forma $k_i' = \frac{k_i}{K_i}$ en cada reacción <i>i</i> , (min ⁻¹).
K_i	Parámetro cinético relacionado con la afinidad de por el sustrato de cada reacción <i>i</i> , (μM).
K_i'	Parámetro cinético cuyo valor es el inverso de K _i para cada reacción <i>i</i> , (μM ⁻¹).

K_I	Constante de inhibición en la cuarta reacción de ruta 4S por la presencia del compuesto HBP (μM).
K_S'	Parámetro cinético cuyo valor es el inverso de la constante de inhibición K _I para la cuarta reacción de la ruta 4S, (μM^{-1}).
LB	Medio de crecimiento complejo Luria-Bethany empleado durante el crecimiento del microorganismo.
N	Número de datos experimentales empleados en el ajuste.
NC	Número de compuestos clave.
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina.
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.
P_{BDS}^{máx}	Productividad máxima (%/min).
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
\dot{r}	Matriz columna que contiene por elementos las cuatro velocidades de reacción para la ruta 4S.
\dot{R}	Matriz columna que contiene por elementos las velocidades de producción de los cuatro elementos clave escogidos para el esquema de reacción simplificado de la ruta 4S.
r_i	Velocidad de la reacción <i>i</i> ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).
R_j	Velocidad de producción del compuesto <i>j</i> ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).
R_{DBT}⁰	Velocidad inicial de eliminación de DBT ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).
S_i	Constante de desactivación del parámetro k _i para la reacción <i>i</i> , (min^{-1}).
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SRC	Suma de residuos al cuadrado dividido por el número de elementos.

t_k :	Tiempo en el desarrollo del experimento de tipo k (h) (min).
t_s :	Parámetro estadístico t de <i>Student</i> .
UA:	Unidades de absorbancia.
w :	Peso asociado al componente j en el ajuste.
X_{BDS} :	Grado de desulfuración (%).
Y_{XS} :	Rendimiento de la fuente de azufre en biomasa ($\mu\text{M/g}$ peso seco).

Símbolos griegos

Δ	Denota una variación o mejora en un parámetro al modificar la concentración de biomasa empleada manteniendo el resto de las condiciones constantes. Ver expresiones 5.4 y 5.5.
δ	Parámetro de la expresión 4.1.
ε	Parámetro de la expresión 4.1.
μ	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
μ'	Parámetro cinético que relaciona la velocidad específica de crecimiento y la concentración inicial del sustrato azufrado, $\mu' = \mu / C_S^0$ ($\text{L}/\mu\text{mol/h}$).
ν_{ij}	Coefficiente estequiométrico del compuesto j en la reacción i de la ruta 4S.
$\dot{\nu}$	Matriz de coeficientes estequiométricos formada por i filas y j columnas, siendo cada elemento el coeficiente estequiométrico ν correspondiente al compuesto clave j en la reacción i de la ruta 4S.
$\dot{\nu}^{-1}$	Inversa de la matriz de coeficientes estequiométricos $\dot{\nu}$.

Subíndices

- 1 :** Relativo a la primera reacción de la ruta 4S ($\text{DBT} \xrightarrow{\text{DszC}} \text{DBTO}$).
- 2 :** Relativo a la segunda reacción de la ruta 4S ($\text{DBTO} \xrightarrow{\text{DszC}} \text{DBTO}_2$).
- 3 :** Relativo a la tercera reacción de la ruta 4S ($\text{DBTO}_2 \xrightarrow{\text{DszA}} \text{HBPS}$).
- 4 :** Relativo a la última reacción de la ruta 4S ($\text{HBPS} \xrightarrow{\text{DszB}} \text{HBP}$).
- BDS :** Relativo al proceso de biodesulfuración en condiciones de *resting cells*.
- C :** Relativo al proceso de biodesulfuración en condiciones de crecimiento.
- DBT:** Relativo a dibenzotiofeno.
- DBTO:** Relativo a dibenzotiofeno-5-óxido (sulfóxido).
- DBTO₂:** Relativo a dibenzotiofeno-5,5-dióxido (sulfona).
- HBP:** Relativo a 2-hidroxibifenilo.
- HBPS:** Relativo a 2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato (sulfinato)
- prot :** Relativo a proteína celular total.
- S :** Relativo a la fuente de azufre.
- teo :** Relativo al valor teórico.
- X:** Relativo a biomasa.

Superíndices

- 0:** Relativo a tiempo cero.
- °:** Denota una matriz o vector.
- ‘:** Denota parámetro referido a biomasa.
-

2:	Relativo a 2 horas de tiempo de ensayo.
5:	Relativo a células de 5 horas de tiempo de crecimiento.
5+23:	Relativo al conjunto formado por células de 5 y 23 horas de tiempo de crecimiento.
9:	Relativo a células de 9 horas de tiempo de crecimiento.
23:	Relativo a células de 23 horas de tiempo de crecimiento.
exp :	Relativo al valor experimental.
m :	Relativo al valor medio.
máx :	Relativo al valor máximo
t :	Relativo a tiempo t .
T	Relativo a la cantidad total de biomasa.
teo :	Relativo al valor teórico.
$X_{BDS}^{máx}$:	Relativo al valor en que se alcanza al grado de desulfuración máximo a lo

.

9. BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

Abbad-Andaloussi, S., Warzywoda, M. y Monot, F., 2003, Microbial desulfurization of diesel oils by selected bacterial strains, *Oil & Gas Science and Technology-Revue de Institut Français du Pétrole*, 58 (4), 505-513.

Ágeda, V. I., 2006, Desulfuración de combustibles por adsorción en fase líquida sobre adsorbentes polares micro y mesoporosos, *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Akbarzadeh, S., Raheb, J., Aghaei, A. y Karkhane, A. A., 2003, Study of desulfurization rate in *Rhodococcus* FMF native bacterium, *Iran J. Biotech.*, 1, 36-40.

Alcón, A., Martín, A. B., Santos, V. E., Yustos, P. y García-Ochoa, F., 2005, Biodesulfurisation of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC ctivity, *Biochem. Eng. J.*, 26, 168-175.

Alcón, A., Martín, A. B., Santos, V. E., Gómez, E. y García-Ochoa, F., 2008, Kinetic model for DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CECT5279, *Biochem. Eng. J.*, 39, 486-495.

Alves, L., Salgueiro, R., Rodrigues, C., Mesquita, E., Matos, J. y Gírio, F. M., 2005, Desulfurization of dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* strain 1B, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 120, 199-208.

Alves, L., Marques, S., Matos, J., Tenreiro, R. y Gírio, F. M., 2007, ibenzothiophene desulfurization by *Gordonia alkanivorans* strain 1B using recycled paper sludge hydrolyzate, *Chemosphere*, 70, 967-973.

Babich, I. V. y Moulijn, J. A., 2003, Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review, *Fuel*, 82, 607-631.

Bailey, J. E. y Ollis, D. F., 1983, "Biochemical Engineering Fundamentals", Nueva York: Mc Graw-Hill.

Bates, T. S., Lamb, B. K., Guenther, A., Stoiber, R. E. y Dignon, J., 1992,. Sulfur Emissions to the Atmosphere from Natural Sources, *J. Atmos. Chem.*, 14, 315-337.

Bezalel, L., Hader, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P. y Cerniglia, C. E., 1996,. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Microbiol.*, 62, 2554-2559.

Bhatia, S. y Sharma, D. K., 2006, Emerging role of biodesulfurization of heavier crude oils and integration of biorefining with petroleum refineries in the future, *Pet. Sci. Technol.*, 24, 1125-1159.

Borole, A. P., Kaufman, E. N., Grossman, M. J., Minak-Bernero, V., Bare, R. y Lee, M. K., 2002, Comparison of the emulsion characteristics of *Rhodococcus erythropolis* and *Escherichia coli* SOXC-5 cells expressing biodesulfuration genes, *Biotechnol. Prog.*, 18, 88-93.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005, "Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2, The proteobacteria. Part B, The gammaproteobacteria", G. Garrity, Ed., Nueva York: Springer.

British Petroleum, 2007, "BP Statistical Review of World Energy", Londres: BP p.I.C.

Calzada, J., Zamarro, M. T., Alcón, A., Santos, V. E., García, J. L. y García-Ochoa, F., 2009, Analysis of dibenzothiophene desulfurization in a recombinant *Pseudomonas putida* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (3), 875-877.

Caro, A., 2006. Desulfuración de fracciones petrolíferas, *Tesis Doctoral*, Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares.

- Caro, A., Boltes, K., Letón, P. y García-Calvo, E., 2007a**, Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria, *Biochem. Eng. J.*, 35, 191-197.
- Caro, A., Letón, P., García-Calvo, E. y Setti, L., 2007b**, Enhancement of dibenzothiophene biodesulfurization using β -cyclodextrins in oil-to-water media, *Fuel*, 86 (16), 2632-2636.
- Caro, A., Boltes, K., Letón, P. y García-Calvo, E., 2008a**, Description of by-product inhibition effects on biodesulfurization of dibenzothiophene in biphasic media. *Biodegradation*, 19, 599-611.
- Caro, A., Boltes, K., Letón, P. y García-Calvo, E., 2008b**, Biodesulfurization of dibenzothiophene by growing cells of *Pseudomonas putida* CECT 5279 in biphasic media, *Chemosphere*, 73, 663–669.
- Castillo, F., Roldán, M. D., Blasco, P., Huertas, M. J., Caballero, F. J., Moreno-Vivián, C. y Martínez-Luque, M., 2007**, "Biotecnología ambiental", Madrid: Tébar, D.L.
- Castorena, G., Suárez, C., Valdez, I., Amador, G., Fernández, L. y Le Borgne, S., 2002**, Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus sp.* strains, *FEMS. Microbiol. Lett.*, 215, 157-161.
- Chen, H., Zhang, W. J., Chen, J. M., Cai, Y. B. y Li, W., 2008**, Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6-DMDBT by *Mycobacterium sp.* ZD-19, *Bioresour. Technol.*, 99, 3630-3634.
- Chen, H., Cai, Y.-B., Zhang, W.-J. y Li, W., 2009**, Methoxylation pathway in biodesulfurization of model organosulfur compounds with *Mycobacterium sp.*, *Bioresour. Technol.*, 100, 2085-2087.
- Comunidades Europeas, 1993**, Directiva 93/12/CEE del Consejo, de 23 de marzo de 1993, relativa al contenido de azufre de determinados combustibles líquidos, *Diario Oficial n° L 074 de 27/03/1993*, 81-83.
- Constanti, M., Giralt, J. y Bordons, A., 1994**, Desulfurization of dibenzothiophene by bacteria, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 510-516.

Crawford, D. L. y **Gupta**, R. K., **1990**, Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*, *Curr. Op. Microbiol.*, 21, 229-231.

Darzins, A. y **Mrachko**, G. T., **1998**, "Sphingomonas biodesulfurization catalyst", *Patent WO9845446A1*.

de Lorenzo, V. y **Timmis**, K. N., **1994**, Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived minitransposons, *Methods Enzymol.*, 235, 386-405.

de Ranson, I. y **Rivas**, C., **1999**, Biocatalizador para remover azufre orgánico en hidrocarburos, *Visión Tecnológica*, 7(1), 15-20.

Denis-Larose, C., **Labbe**, D., **Bergeron**, H., **Jones**, A. M., **Gree**, C. W., **Al-Hawari**, J., **Grossman**, M.J., **Sankey**, B.M. y **Lau**, P.C.K., **1997**, Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococci*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2915-2919.

Dennis, J. E., **Gay**, D. M. y **Welsch**, R. E., **1981**, Algorithm 573: NL2SOL—An Adaptive Nonlinear Least-Squares Algorithm, *ACM T. Math. Software*, 7 (3), 369-383.

Denome, S. A., **Olson**, E. S. y **Young**, K. D., **1993**, Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2837-2843.

Denome, S. A., **Oldfield**, C., **Nash**, L. J. y **Young**, K., **1994**, Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8, *J. Bacteriol.*, 176, 6707-6716.

Duarte, G. F., **Rosado**, A. S., **Seldin**, L., **De Araujo**, W. y **Van Elsas**, J. D., **2001**, Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1052-1062.

Dudley, M. W. y **Frost**, J. W., **1994**, Biocatalytic desulfurization of arylsulfonates, *Bioorg. Med. Chem.*, 2, 681-690.

Energy Information Agency, 2008, *Forecasts & Analyses*, consultado el 27 de abril de 2009, de <http://www.eia.doe.gov/oiaf/forecasting.html>

Environmental Protection Agency, 2007, *Acid rain*, consultado el 20 de abril de 2009, de <http://www.epa.gov/acidrain/effects/index.html>

España, 1999, Real Decreto 1728/1999, de 12 de noviembre, por el que se fijan las especificaciones de los gasóleos de automoción y de las gasolinas, *B.O.E. n° 272 13/11/1999*, 39659-39664.

España, 2003, Real Decreto 1700/2003, de 15 de diciembre, por el que se fijan las especificaciones de gasolinas, gasóleos, fuelóleos y gases licuados del petróleo y el uso de biocarburantes, *B.O.E. n° 307 24/12/2003*, 45961-45971.

Esser, J., Wasserscheid, P. y Jess, A., 2004, Deep desulfurization of oil refinery streams by extraction with ionic liquids, *Green Chem.*, 6, 316-322.

European Environment Agency, 2008a, *EEA Report No. 6/2008 Energy and environment report 2008*. Copenhagen: EEA.

European Environment Agency, 2008b, *EEA Technical report No 7/2008 Annual European Community LRTAP Convention emission inventory report 1990-2006*. Copenhagen: EEA.

Finlayson-Pitts, B. J. y Pitts, J. N, 2000, "Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere. Theory, Experiments and Applications", San Diego, California, EE.UU., Academic Press.

Finnerty, W. R. y Robinson, M., 1986, Microbial desulfurization of fossil fuels: a review, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 16, 205-221.

Folsom, B. R., Schieche, D. R., DiGrazia, P. M., Werner, J. y Palmer, S., 1999, Microbial Desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (11), 4967-4972.

Font, J. y Fabregat, A., 1995, Testing a predictor-corrector integral method for estimating parameters in complex kinetic systems described by ordinary differential equations. *Comput. Chem. Eng.*, 21 (7), 719-731.

Frassinetti, S., Setti, L., Corti, A., Farinelli, P., Montevecchi, P. y Vallini, G., 1998, Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*, *Can. J. Microbiol.*, 44(3), 289-297.

Furuya, T., Kirimura, K., Kino, K. y Usami, S., 2001, Thermophilic biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives by *Mycobacterium phlei* WU-F1, *FEMS Microbiol. Lett.*, 204 (1), 129-133.

Furuya, T., Takahashi, S., Ishii, Y., Kino, K. y Kirimura, K., 2004, Cloning of a gene encoding flavin reductase coupling with dibenzothiophene monooxygenase through coexpression screening using indigo production as selective indication, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313 (3), 570-575.

Galán, B., Diaz, E. y García, J., 2000, Enhancing desulfurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts, *Environ. Microbiol.*, 2, 687-694.

Gallagher, J. R., Olson, E. S. y Stanley, D. C., 1993, Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway, *FEMS Microbiol. Lett.*, 107, 31-36.

Gallardo, M., Ferrández, A., de Lorenzo, V., García, J. L. y Diéz, E., 1997, Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization, *J. Bacteriol.*, 179, 7156-7160.

García-Ochoa, F., Romero, A., Santos, V. E. y Rodriguez, C. O., 1989, Estudio del método diferencial en la determinación de modelos cinéticos de reacciones complejas, *An. Quím.*, 85, 542-556.

García-Ochoa, F., Romero, A. y Santos, V. E., 1990, Comparación de métodos de determinación de parámetros cinéticos en reacciones complejas, *An. Quím.*, 86 (6), 625-637.

García-Ochoa, F., Romero, A. y Santos, V. E., **1992**, Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions, *Int. Chem. Eng.*, 32 (2), 538-551.

Gautschi, W., **1997**, "Numerical Analysis: An Introduction", Boston: Birkhäuser.

Gómez, E., Santos, V. E., Alcón, A., Martín, A. B. y García-Ochoa, F., **2006**, Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability, *Energy Fuels*, 20, 1565-1571.

Gray, K. A., Pogrebinsky, O. S., Mrachko, G. T., Xi, L., Monticello, D. J. y Squires, D. J., **1996**, Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels, *Nat. Biotechnol.*, 14, 1705-1709.

Gray, K. A., Mrachko, G. T. y Squires, C. H., **2003**, Biodesulfurization of fossil fuels, *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 229-235.

Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Garrett, K. K., George, G. N. y Pickering, I. J., **1999**, Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1), 181-188.

Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Minak-Bernero, V., George, G. N. y Pickering, I. J., **2001**, Deep desulfurization of extensively hydrosulfurized middle distillate oil by *Rhodococcus sp.* strain ECRD-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1949-1952.

Gunam, I. B.W., Yaku, Y., Hirano, M., Yamamura, K., Tomita, F., Sone, T. y Asano, K., **2006**, Biodesulfurization of alkylated forms of dibenzothiophene and benzothiophene by *Sphingomonas subarctica* T7b, *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 322-327.

Gupta, N., Roychoudhury, P. K. y Deb, J. K., **2005**, Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66 (4), 356-366.

Haines, T. A., **1986**, "Acid Deposition: Long-Term Trends", Washington: National Academy Press.

Henry, J. G. y Heinke, G. W., 1999, "Ingeniería ambiental", México, Prentice Hall.

Hernández del Olmo, C., 2004, Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Hernández-Maldonado, A. J. y Yang, R. T., 2004, Desulfurization of Transportation Fuels by Absorption, *Catal. Rev. Sci. Eng.*, 46(2), 111-150.

Himmelblau, D. M., Jones, C. R. y Bischoff, K. B., 1967, Determination of Rate Constants for Complex Kinetics Models, *Ind. Eng. Chem. Fundamen.*, 6 (4), 539-543.

Hirasawa, K., Ishii, Y., Kobayashi, M., Kozumi, K. y Maruhashi, K., 2001, Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 239-246.

Hou, C. T. y Laskin, A. J., 1976, Microbial conversión of dibenzothiophene, *Develop. Ind. Microbiol.*, 17, 351-362.

International Energy Agency Office, 2009, *Key World Energy Statistics*. París: OECD/IEA.

Ishii, Y., Kobayashi, M., Konishi, J., Onaka, T., Okumura, K. y Suzuki, M., 1998, Desulfurization of Petroleum by the Use of Biotechnology, *Nippon Kagaku Kaishi (J. Chem. Soc. Jpn.)*, 6, 373-381.

Ishii, Y., Konishi, J., Okada, H., Hirasawa, H., Onaka, T. y Suzuki, M., 2000, Operon structure and functional analysis of the genes encoding thermophilic desulfurizing enzymes of *Paenibacillus* sp. A11-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 81-88.

Ishii, Y., Ohshiro, T., Aoi, Y., Suzuki, M. y Izumi, Y., 2000b, Identification of the Gene Encoding a NAD(P)H-Flavin Oxidoreductase Coupling with Dibenzothiophene (DBT)-Desulfurizing Enzymes from the DBT- nondesulfurizing Bacterium *Paenibacillus polymyxa* A-1, *J. Biosci. Bioeng.*, 90 (2), 220-222.

Izumi, Y., Oshiro, T., Ogino, H., Hine, Y. y Shimao, H., **1994**, Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 223-226.

Jia, X., Wen, J., Sun, Z., Caiyin, Q. y Xie, S., **2006**, Modeling of DBT biodegradation behaviors by resting cells of *Gordonia* sp. WQ-01 and its mutant in oil–water dispersions, *Chem. Eng. Sci.*, 61, 1987-2000.

Kardinahl, S., Schmitz, C. L., Peterson, A. y Schaefer, G., **1996**, Isolation, characterization and crystallization of an iron-superoxide dismutase from the crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 138, 65-70.

Kayser, K. J., Cleveland, L., Park, H., Kwak, J., Kolhatkar, A. y Kilbane II, J. J., **2002**, Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 737-746.

Kayser, K. J., **2005**, "System and method for introduction and stabilization of genes in *Thermus* sp.", *U.S. Patent No. 20030170900* .

Kertesz, M. A., **1999**, Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 135-175.

Kertesz, M. A. y **Wirtek**, C., **2001**, Desulfurization and desulfonation: application of sulfur-controlled gene expression in bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 460-466.

Kilbane II, J. J., **1990**,. Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds, *Resources Conserv. Recycling*, 3, 69-79.

Kilbane II, J. J. y **Jackowski**, K., **1992**, Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, *Biotechnol. Bioeng.*, 40 (9), 1107-1114.

Kilbane II, J. J., **2006**, Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 305-314.

Kim, T. S., Kim, H. Y. y Kim, B. H., **1990**, Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide, *Biotechnol. Lett.*, 12, 757-761.

Kim, B. H., Kim, H. Y., Kim, T. S. y Park, D. H., **1995**, Selectivity of desulfurization activity of *Desulfovibrio desulfuricans* M6 on different petroleum products, *Fuel. Process. Technol.*, 43, 87-94.

Kirimura, K., Furuya, T., Nishii, Y., Ishii, Y., Kino, K. y Usami, S., **2001**, Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B, *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 262-266.

Kobayashi, M., Onaka, T., Ishii, Y., Konishi, J., Takaki, M., Okada, H., Ohta, Y., Koizumi, K. y Suzuki, M., **2000**, Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strain, *FEMS. Microbiol. Lett.*, 187, 123-126.

Kobayashi, M., Horiuchi, K., Yoshikawa, O., Hirasawa, K., Ishii, Y., Fujino, K., Sugiyama, H. y Maruhashi, K., **2001**, Kinetic Analysis of Microbial Desulfurization of Model and Light Gas Oils Containing Multiple Alkyl Dibenzothiophenes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(2), 298-304.

Kodama, K., Nakatani, S., Umehara, K., Shimizu, K., Minoda, Y. y Yamada, K., **1970**, Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part III. Isolation and identification of products from dibenzothiophene, *Agric. Biol. Chem.*, 34, 1320-1324.

Kodama, K., Umehara, K., Shimizu, K., Nakatani, S., Minoda, Y. y Yamada, K., **1973**, Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 45-50.

Konishi, J., Ishii, Y., Onaka, T., Okumura, K. y Suzuki, M., **1997**, Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(8), 3164-3169.

Konishi, J., Ishii, Y., Onaka, T., Ohta, Y., Suzuki, M. y Maruhashi, K., **2000**, Purification and Characterization of Dibenzothiophene Sulfone Monooxygenase and FMN-Dependent NADH Oxidoreductase from the Thermophilic Bacterium *Paenibacillus* sp. Strain Al 1-2, *J. Biosci. Bioeng.*, 90(6), 607-613.

Kropp, K. G. y **Fedorak, P. M.**, **1998**, A review of the occurrence, toxicity, and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum, *Can. J. Microbiol.*, 44, 605-622.

Labana, S., Pandey, G. y Jain, R. K., **2005**, Desulphurization of dibenzothiophene and diesel oils by bacteria, *Lett. Appl. Microbiol.*, 40, 159-163.

Laborde, A. y **Gibson, D. T.**, **1977**, Metabolism of dibenzothiophene by *Beijerinckia* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 783-790.

Laemmli, U. K., **1970**, Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.

Larkin, M., De Mot, R., Kulakov, L. y Nagy, I., **1998**, Applied aspects of *Rhodococcus* genetics, *Antonie Leewenhoek*, 74, 133-153.

Le Borge, S. y **Quintero, R.**, **2003**, Review Biotechnological processes for the refining of petroleum, *Fuel Process. Technol.*, 81, 155-169.

Lee, M. K., Senius, J. D. y Grossman, M. J., **1995**, Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4362-4366.

Li, F. L., Xu, P., Ma, C. Q., Luo, L. L. y Wang, X. S., **2003**, Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp X7B, *FEMS Microbiol. Lett.*, 223(2), 301-307.

Li, W., Wang, M. D., Chen, H., Chen, J. M. y Shi, Y., **2006**, Biodesulfurization of dibenzothiophene by growing cells of *Gordonia* sp. in batch cultures. *Biotechnol. Lett.*, 28, 1175-1179.

- Li, Y.-G., Ma, J., Zhang, Q.-Q., Wang, C. S. y Chen, Q., 2007a**, Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* NCC-1. *Chin. J. Organic. Chem.*, 25, 400-405.
- Li, C. Q., Ma, T., Li, S. S., Li, H., Liang, F. L. y Liu, R. L., 2007b**, Improvement of dibenzothiophene desulfurization activity by removing the gene overlap in the *dsz* operon, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 849-854.
- Luo, M. F., Xing, J. M., Gou, Z. X., Li, S. y Liu, H. Z., 2003**, Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane, *Biochem. Eng. J.*, 13(1), 1-6.
- Ma, C. Q., Feng, J. H., Zeng, Y. Y., Cai, X. F., Sun, B. P., Zhang, Z., Blankespoor, H.B. y Xu, P., 2006a**, Methods for the preparation of a biodesulfurization biocatalyst using *Rhodococcus sp.*, *Chemosphere*, 65, 165-169.
- Ma, T., Li, G., Li, J., Liang, F. y Liu, R., 2006b**, Desulfurization of dibenzothiophene by *Bacillus subtilis* recombinants carrying *dszABC* and *dszD* genes, *Biotechnol. Lett.*, 28, 1095-1100.
- Ma, T., Li, S., Li, G., Wang, R., Liang, F. y Liu, R., 2006c**, Cloning and expressing DBT (dibenzothiophene) monooxygenase gene (*dszC*) from *Rhodococcus sp.* DS-3 in *Escherichia coli*, *Frontiers of Biology in China*, 1, 375-380.
- MacDonald, B. C., Denmead, O. T., White, I. y Melville, M. D., 2004**, Natural sulfur dioxide emissions from sulfuric soils, *Atmos. Environ.*, 38, 1473-1480.
- Maghsoudi, S., Kheiriloom, A., Vossoughi, M., Tanaka, E. y Katoh, S., 2000**, Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium sp.* strain P32C1, *Biochem. Eng. J.*, 5, 11-16.
- Malik, K. A., 1978**, Microbial removal of organic sulphur from crude oil and the environment: some new perspectives, *Process Biochem.*, 40, 2015-2020.
- Martín, A. B., Alcón, A., Santos, V. E. y García-Ochoa, F., 2004**, Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for dibenzothiophene (DBT) biodesulfurization for different media compositions, *Energy Fuels*, 18(3), 851-857.

Martín, A. B., 2005. Desulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* CECT 5279, *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Martin, A. B., Alcón, A., Santos, V. E. y García-Ochoa, F., 2005, Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT Biodesulfurization: Influence of the Operational Conditions, *Energy Fuels*, 19, 775-782.

Matsui, T., Hirasawa, K.-I., Koizumi, K. I., Maruhashi, K. y Kurane, R., 2001, Optimization of the copy number of dibenzothiophene desulfurizing genes to increase the desulfurization, *Biotechnol. Lett.*, 23, 1715-1718.

McFarland, B., 1999,. Biodesulfurization, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 257-264.

Mohebbali, G., Ball, A. S., Rasekh, B. y Kaytash, A., 2006, Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A, *Enzyme. Microb. Technol.*, 40, 578-584.

Mohebbali, G. y Ball, A. S., 2008, Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels, *Microbiology*, 154, 2169-2183.

Monticello, D. J. y Finnerty, W. R., 1985, Microbial desulfurization of fossil fuels, *Annu. Rev. Microbiol.*, 39, 371-389.

Monticello, D. J., 2000, Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11(6), 540-546.

Nakatani, S., Akasaki, T., Kodama, K., Minoda, Y. y Yamada, K., 1968, Microbial conversión of petro-sulfur compounds. Part II. Culture conditions at dibenzothiophene-utilizing bacteria, *Agric. Biol. Chem.*, 32, 1205-1211.

Nekodzuka, S., Toshlaki, N., Nakallma-Kambe, T., Nobura, N., Lu, J. y Nakahara, Y., 1997, Specific desulfurization of dibenzothiophene by *Mycobacterium* strain G3, *Biocatal. Biotransform.*, 15, 21-27.

Nielsen, J. y Villadsen, J., 1992, Modelling of microbial kinetics, *Chem. Eng. Sci.*, 47(17-18), 4225-4270.

Noda, K., Watanabe, K., & Maruhashi, K., 2003a, Recombinant *Pseudomonas putida* carrying both the *dsz* and *hcu* genes can desulfurize dibenzothiophene in n-tetradecane, *Biotechnol. Lett.*, 25(14), 147-1150.

Noda, K.-I., Watanabe, K. y Maruhashi, K., 2003b, Isolation of the *Pseudomonas aeruginosa* gene affecting uptake of dibenzothiophene in n-tetradecane, *J. Biosci. Bioeng.*, 95(5), 504-511 .

Ohshiro, T., Hine, Y. e Izumi, Y., 1994, Enzymatic desulfurization of DBT by a cell-free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1, *FEMS Microbiol. Lett.*, 118, 341-344.

Ohshiro, T., Hirata, T. e Izumi, Y., 1995a, Microbial desulfurization of dibenzothiophene in the presence of hydrocarbon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 249–252.

Ohshiro, T., Kanbayashi, Y., Hine, Y. e Izumi, Y., 1995b, Involvement of flavin coenzyme in dibenzothiophene degrading enzyme system from *Rhodococcus erythropolis* D-1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1349-1351.

Ohshiro, T., Hirata, T., Hashimoto, I. e Izumi, Y., 1996, Characterization of DBT desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2 in the presence of hydrocarbon, *J. Ferment. Bioeng.*, 82(6), 610-612.

Ohshiro, T., Kojima, T., Torii, K., Kawasoe, H. e Izumi, Y., 1999, Purification and characterization of dibenzothiophene (DBT) sulfone monooxygenase, an enzyme involved in DBT desulfurization, from *Rhodococcus erythropolis* D-1, *J. Biosci. Bioeng.*, 88, 610-616.

Ohshiro, T. e Izumi, Y., 1999, Review: Microbial desulfurization of organic compounds in petroleum, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(1), 1-9.

Okada, H. O., Nomura, N., Nakahara, T. y Maruhashi, K., 2002, Analyses of substrate specificity of the desulfurizing bacterium *Mycobacterium sp.* G3, *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 228-233.

Oldfield, C., Pogrebinsky, O., Simmonds, J., Olson, E. y Kulpa, C., **1997**, Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968), *Microbiology*, 143, 2961-2973.

Olson, E. S., Stanely, D. C. y Gallagher, J. R., **1993**, Characterization of intermediates and dibenzothiophene, *Energy Fuels*, 7, 159-64.

Olson, G. J., **2000**, "Microbial catalyst for desulfurization of fossil fuels", U.S. Patent No. 6124130 .

Omori, T., Monna, L., Saiki, Y. y Kodama, T., **1992**, Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 911-915.

Onaka, T., Konishi, J., Ishii, Y. y Maruhashi, K., **2001**, Desulfurization characteristics of thermophilic *Paenibacillus* sp. strain A11-2 against asymmetrically alkylated dibenzothiophenes, *J. Biosci. Bioeng.*, 92(2), 193-196.

ONU, **2009**, *Human Development Indices*, consultado el 11 de octubre de 2009, de <http://hdr.undp.org>

Pacheco, M. A., Lange, E. A., Pienkos, P. T., Yu, L. Q., Rouse, M. P., Lin, Q. y Linguist, L., **1999**, Recent advances in biodesulfurization of diesel fuel, *Annual Meeting, National Petrochemical and Refiners Association*, 1-26, San Antonio, Texas, USA.

Palleroni, N. J. y **Doudoroff**, M., **1972**, Some Properties and Taxonomic Sub-Divisions of the Genus *Pseudomonas*, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 10, 73-100.

Pearl, R. y **Reel**, L. L., **1920**, On the rate growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation, *PNAS*, 6(6), 275-288.

Pinches, A. y **Pallent**, L. J., **1986**, Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media, *Biotech. Bioeng.*, 28, 1484-1496.

Prieto, M. A., Díaz, E. y García, J. L., **1996**,. Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster, *J. Bacteriol.*, 178, 111-120.

Purdy, R. F., Lepo, J. E. y Ward, B., **1993**, Biodesulfurization of organic-sulfur compounds, *Curr. Microbiol.*, 27, 219-222.

Reichmuth, D. S., Hittle, J. L., Blanch, H. W. y Keasling, J., **2000**, Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of a *Vibrio harveyi* oxidoreductase gene, *Biotechnol. Bioeng.*, 67(1), 72-79 .

Rhee, S. K., Chang, J. H., Chan, Y. K. y Chang, H. N., **1998**, Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordona* strain, CYKS1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2327-2331.

Santos, S. C., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Pádula, M., Leitão, A. C., Martins, O. B., Ribeiro, C. M. S., Sassaki, M. Y. M., Matta, C. P. S., Bevilacqua, J.; Sebastián, G. V. y Seldin, L., **2006**, Characterization of *Gordonia* sp. strain F.5.25.8 capable of dibenzothiophene desulfurization and carbazole utilization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 355-362.

Santos, V. E., Alcón, A., Martín, A. B., Gómez, E. y García-Ochoa, F., **2007**, Desulfurization of dibenzothiophene using the 4S enzymatic route: Influence of operational conditions on initial reaction rates, *Biocatal. Biotransform.*, 25(2-4), 286-294.

Sato, H. y **Clark**, D. P., **1995**, Degradation of dibenzothiophene sulfoxide and sulphone by *Arthrobacter* strain DBTS2, *Microbios.*, 83, 145-159.

Schlenk, D., Bevers, R. J., Vertino, A. M. y Cerniglia, C. E., **1994**, P450 catalyzed S-oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*, *Xenobiotica*, 24, 1077-1083.

Schubert, E. y **Hofmann**, H., **1976**, Reaction Engineering, 1. Stoichiometry of complex reactions, *Int. chem. Eng.* 16(1), 132.

Setti, L., Lanzarini, G. y Pifferi, P. G., **1994**, Diffusion as a rate controlling step in heavy-oil biodesulfurization processes, *Fuel Process Technol*, 40, 311-317.

Setti, L., Lanzarini, G. y Pifferi, P., **1997**, Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process, *Fuel Process Technol.*, 52, 145-153.

Shavandi, M., Sadeghizadeh, M., Zomorodipour, A. y Khaleh, K., **2009**, Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RPI90A, *Bioresource Technology*, 100, 475-479.

Shong, R. G., **1999**, Bioprocessing of crude oils, *Preprints of the Division of Fuel Chemistry of the American Chemical Society*, 44(1), 1-4.

Soleimani, M., Bassi, A. y Margaritis, A., **2007**, Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels, *Biotechnol. Adv.*, 25, 570-596.

Srinivasaraghavan, K., Sarma, P. M. y Lal, B., **2006**, Comparative analysis of phenotypic and genotypic characteristics of two desulfurizing bacterial strains, *Mycobacterium phlei* SM120-1 and *Mycobacterium phlei* GTIS10, *Lett. Appl. Microbiol.*, 42, 483-489.

Strawinski, R. J., **1950**, "Method of desulfurizing crude oil", *U.S. Patent No. 2521761*.

Suzuki, M., **1999**, Enzymology and molecular genetics of biodesulfurization, *Recent Res. Devel. Microbiology*, 3, 515-534.

Tao, F., Yu, B., Xu, P. y Ma, C. Q., **2006**, Biodesulfurization in Biphasic Systems Containing Organic Solvents, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 4604-4609.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J., **1979**, Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, 4350-4354.

UN-Energy, **2005**, *Energy in the United Nations: An Overview of UN-Energy Activities*, consultado el 18 de abril de 2009, de http://esa.un.org/un-energy/pdf/un_energy_overview.pdf

Unión Europea, 1994, Directiva 94/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de marzo de 1994, relativa a las medidas que deben adoptarse contra la contaminación atmosférica causada por las emisiones de los vehículos de motor y por la que se modifica la Directiva 70/220/CEE, *Diario Oficial L100 de 19.4.1994.*, 42-52.

Unión Europea, 1996, Directiva 96/62/CE del Consejo de 27 de septiembre de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, *Diario Oficial n° L 296 de 21/11/1996*, 55–63.

Unión Europea, 1998, Directiva 98/69/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 1998 relativa a las medidas que deben adoptarse contra la contaminación atmosférica causada por las emisiones de los vehículos de motor y por la que se modifica la Directiva 70/220/CEE del Consejo, *Diario Oficial L350 de 28.12.1998*, 1-57.

Unión Europea, 1998b, Directiva 98/70/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 1998 relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo y por la que se modifica la Directiva 93/12/CEE del Consejo, *Diario Oficial n° L 350 de 28/12/1998*, 58-68.

Unión Europea, 1999, Directiva 1999/30/CE del Consejo de 22 de abril de 1999 relativa a los valores límite de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y óxidos de nitrógeno, partículas y plomo en el aire ambiente, *Diario Oficial n° L 163 de 29/06/1999*, 41-60.

Unión Europea, 2003, Directiva 2003/17/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de marzo de 2003, por la que se modifica la Directiva 98/70/CE relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo, *Diario Oficial L76 de 22.3.2003.*, 10-19.

United States National Library of Medicine, 2008, *Hazardous Substances Data Bank*, consultado el 20 de abril de 2009, de <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>

Van Affender, M., Schacht, S., Klein, J. y Trüper, H. G., 1990, Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium sp.* DO, *Arch. Microbiol.*, 153, 324-328.

Van Hamme, J. D., Singh, A. y Ward, O. P., **2003**, Recent advances in petroleum microbiology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4), 503-549.

Vázquez, J. A. y **Murado**, M. A., **2008**, Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures Application to evaluation of 15 peptones for lactic acid bacteria productions, *Biochem. Eng. J.*, 39, 276-287.

Verhulst, P. F., **1838**, Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement, *Corresp. Math. Phys.*, 10, 113–121.

Verhulst, P. F., **1845**, Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population, *Nouvelle Mémoires de l'Academie Royale des Sciences et Belles-Lettres de Bruxelles*, 18, 1-41.

Wang, P. y Krawiec, S., **1994**, Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains, *Arch. of Microbiol.*, 161(3), 266-271.

Wang, M. D., Li, W., Shi, Y., Wang, D. H. y Feng, H., **2006**, Effects of surfactant on biodesulfurization by *Corynebacterium sp.* ZD-1 in the presence of organic phase, *J. Zhejiang Univ. Sci. A*, 7 (Suppl. II), 371–375.

Watanabe, K., Noda, K.-I. y Maruhashi, K., **2003a**, Selective cleavage of 10-methyl benzo[b] naphtho[2,1-d] thiophene by recombinant *Mycobacterium sp.* strain, *Biotechnol. Lett.*, 25(10), 797-803.

Watanabe, K., Noda, K.-I. y Maruhashi, K., **2003b**, Enhanced desulfurization in a transposon-mutant strain of *Rhodococcus erythropolis*, *Biotechnol. Lett.*, 25(16), 1299-1304.

Weiss, R. M. y **Ollis**, D. F., **1980**, Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation, *Biotech. Bioeng.*, 22, 859-873.

Xi, L., Squires, C. H., Monticello, D. J. y Childs, J. D., **1997**, A Flavin Reductase Stimulates DszA and DszC Proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 in Vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 73-75 .

Xiong, X.; Xing, J.; Li, X.; Bai, X.; Li, W.; Li, Y. y Liu, H., **2007**. Enhancement of biodesulfurization in two-liquid systems by heterogeneous expression of *Vitreoscilla hemoglobin*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2394-2397.

Xu, P., Yu, B., Li, F. L., Cai, X. F. y Ma, C. Q., **2006**, Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles, *Trends Microbiol.*, 14(9), 398-405.

Yamada, K., Minoda, Y., Kodama, K., Nakatani, S. y Akasaki, T., **1968**, Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part I. Isolation and identification of dibenzothiophene-utilizing bacteria, *Agric. Biol. Chem.*, 32, 840-845.

Yamada, K. O., Morimoto, M. y Tani, Y., **2001**, Degradation of dibenzothiophene by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of only nitrogen gas, *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 91-93.

Yang, J. Z., Hu, Y., Zhao, D., Wang, S., Lau, P. C. y Marison, I. W., **2007**, Two-layer continuous-process design for the biodesulfurization of 2 diesel oils under bacterial growth conditions, *Biochem. Eng. J.*, 37, 212-218.

Yu, L., Meyer, T. y Folsom, B., **1998**, "Oil/water/biocatalyst three-phase separation process", *U.S. Patent No. 5772901* .

Yu, T.-C. y **Shaw**, H., **1998b**, The effect of sulfur poisoning on methane oxidation over palladium supported on γ -alumina catalysts, *Appl. Catal. B*, 18, 105-114.

Yu, B., Xu, P., Shi, Q. y Ma, C., **2006**, Deep desulfurization of diesel oil and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 54-58.

Zhang, Q., Tong, M. Y., Li, Y. S., Gao, H. J. y Fang, X. C., **2007**, Extensive desulfurization of diesel by *Rhodococcus erythropolis*, *Biotechnol. Lett.*, 29, 123-127.

ZoBell, C. E., **1953**, "Process for removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus", *U.S. Patent No. 2641564* .

